



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**ADSORPCE MIKROBIÁLNÍCH BUNĚK NA
MODELOVÉ BIOLOGICKÉ POVRCHY**

ADSORPTION OF MICROBIAL CELLS ON MODEL BIOLOGICAL SURFACES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Janka Mikušová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1393/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Janka Mikušová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název práce:

Adsorpce mikrobiálních buněk na modelové biologické povrchy

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracovat aktuální literární rešerši na téma bakalářské práce.
2. Navrhnout a připravit vhodné modelové povrchy pro následné sorpční experimenty.
3. Provést a vyhodnotit sérii sorpčních experimentů s vybranými modelovými mikroorganismy.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Janka Mikušová
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cieľom bakalárskej práce je vytvorenie modelového sorpčného povrchu vhodného pre štúdium adsorpcie bakteriálneho kmeňa *Lactobacillus rhamnosus* ako reprezentatívneho probiotického bakteriálneho kmeňa. Vytvorenie sorpčného povrchu podľa navrhutej a predovšetkým zoptimalizovanej metódy bolo súčasťou experimentálnej časti práce. Optimalizačná metóda zahŕňala prípravu sorbentu so sorpčným povrchom obsahujúcim mucín, na ktorý sa vybraný bakteriálny kmeň *Lactobacillus rhamnosus* naviaže pomocou špecifickej interakcie. V rámci optimalizácie prípravy sorpčného povrchu bola využitá UV-VIS spektrofotometria pre monitorovanie úbytku mucínu v roztoku pri jeho väzbe na použitý substrát. Pripravené sorpčné povrchy boli podrobené rôznym fyzikálne-chemickým analýzám, ktorých úlohou bolo zobrazenie a charakterizácia povrchu a potvrdenie prítomnosti mucínu. Zásadné postavenie v rámci sledovania a charakterizácie zmien v povrchovej štruktúre sorpčného povrchu mala infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou. Pre detailnejšie zobrazenie povrchovej štruktúry vytvorenej adhéznymi interakciami, ktoré sa podieľajú na adhézii probiotických baktérií bola využitá skenovacia elektrónová mikroskopia. Na záver boli pripravené povrchy využité v pilotnom experimente, pri ktorom bola sledovaná kinetika rastu bakteriálnej kultúry s v prítomnosti a neprítomnosti sorbentu pomocou mikrokolorimetrie. Navrhnutý sorbent sa javí ako vhodný prostriedok pre podrobnú charakterizáciu bakteriálnej adhézie, ktorá je prvým krokom pri tvorbe bakteriálneho biofilmu.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Adsorpcia, adhézia, fyzikálne a chemické interakcie, bakteriálny biofilm, *Lactobacillus rhamnosus*, mucín, spektrofotometria

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis is creating sorption surface suitable for studying adsorption bacterial strain *Lactobacillus rhamnosus*, as representative probiotic bacterial strain. Included in the experimental part of this thesis was the process of creating sorption surface, according to the designed and especially optimized method. Optimization method comprised of preparing sorbent with sorption surface including mucin, on which was the bacterial strain *Lactobacillus rhamnosus* bound to, using specific interaction. UV-VIS spectrophotometry was utilized in the optimization of the sorption surface preparation for monitoring losses of mucin in solution that happens during the bondation on used substrate. Designed sorption surfaces were subjected to various physical-chemical analyses, which roles were displaying and characterisation of surface and confirming the presence of mucin. One of the major components, in the process of observing and characterization of changes in surface structure of the sorption surface, was infrared spectroscopy with Fourier transformation. Scanning electron microscopy was used for more detailed observation of the surface structure, created by adhesive interactions, which participate in probiotic bacteria adhesion. Finally, the created surfaces were used in pilot experiment, during which, the kinetics in growing bacterial culture with and without the presence of sorbent using microcalorimetry were observed. Designed sorbent appears to be a suitable mediator for detailed characterisation of bacterial adhesion, which is the first step in creating bacterial biofilm.

KEYWORDS

Adsorption, adhesion, physical and chemical interactions, bacterial biofilm, *Lactobacillus rhamnosus*, mucin, spectrophotometry

MIKUŠOVÁ, Janka. *Adsorpce mikrobiálních buněk na modelové biologické povrchy*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113456>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne i elektronické zdroje som citovala správne a úplne. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho práce a dekanom FCH VUT.

.....
Janka Mikušová

POĎAKOVANIE

Týmto by som chcela predovšetkým úprimne poďakovať vedúcemu mojej bakalárskej práce Ing. Petru Sedláčkovi, Ph.D. za konzultácie ohľadom študovanej problematiky k experimentálnej i teoretickej časti práce, za cenné rady a pripomienky v priebehu experimentálnej činnosti. Ďalej by som chcela poďakovať konzultantke mojej práce Ing. Eve Slaninovej za ochotu a pomoc pri riešení experimentálnej časti a za rady pri písaní bakalárskej práce. Za pomoc v laboratóriu by som chcela poďakovať tiež Ing. Ivane Nováčkovej. Tiež by som chcela poďakovať Ing. Jitke Krouskej, Ph.D. za pomoc pri mikrokolorimetrických meraniach. V neposlednom rade patrí veľké poďakovanie mojej rodine a priateľom za ich podporu, trpezlivosť a zázemie, ktoré mi tvorili behom doterajšieho štúdia.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1	Fyzikálne-chemické interakcie	9
2.1.1	Adsorpcia	9
2.1.2	Adhézia	12
2.2	Biologický povrch	15
2.2.1	Modelový biologický povrch	15
2.3	Bakteriálny biofilm	17
2.3.1	Charakteristika biofilmu	17
2.3.2	Vznik a vývoj biofilmu	17
2.3.3	Modelový mikroorganizmus – rod <i>Lactobacillus</i>	19
3	SÚČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	21
3.1	Teoretické modely	21
3.2	Metódy používané k štúdiu bunkovej adhézie	21
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	24
4.1	Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje	24
4.1.1	Použitý bakteriálny kmeň	24
4.1.2	Chemikálie	24
4.1.3	Prístroje a zariadenia	24
4.2	Uchovávanie vybranej bakteriálnej kultúry	25
4.3	Kultivácia probiotického kmeňa <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	25
4.4	Optimalizácia metódy prípravy biologického povrchu k stanoveniu bakteriálnej adhézie ...	25
4.4.1	Príprava roztokov	25
4.4.2	Príprava roztoku mucínu	26
4.4.3	Príprava mikročasticových sorbentov	26
4.4.4	Optimalizácia metódy prípravy sorpčného povrchu	26
4.4.5	Príprava vzoriek bakteriálnej kultúry	26
4.4.6	Úprava koncentrácie roztoku mucínu	26
4.4.7	Úprava koncentrácie bakteriálnych buniek	26
4.4.8	Štúdium adhézie buniek na mucín	26
4.4.9	Príprava vzoriek pre infračervenú spektroskopiu a SEM	27
4.5	Charakterizácia povrchu adsorbentov pomocou infračervenej spektroskopie	27
4.6	Skenovacia elektrónová mikroskopia	27
4.7	Charakterizácia vzoriek pomocou mikrokolorimetrie	27
5	Výsledky a diskusia	28
5.1	Návrh a optimalizácia postupu štúdia adsorpcie	28

5.1.1	Výber sorbentu	29
5.1.2	Optimalizácia adsorpčnej koncentrácie mucínu voči sorbentu.....	29
5.1.3	Analýza štruktúry sorbentu pred adsorpciou buniek	31
5.1.1	Analýza štruktúry sorbentu po adsorpcii buniek	34
5.1.2	Vizualizácia sorbentu v jednotlivých krokoch experimentu.....	37
5.1.3	Mikrokalorimetria.....	39
6	ZÁVER.....	42
7	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	44
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	47
8.1	Zoznam použitých skratiek	47
8.2	Zoznam použitých symbolov	47

1 ÚVOD

Medzimolekulové interakcie pôsobiace na fázovom rozhraní medzi molekulami a atómami sú všadeprítomné, či už ide o samotnú adsorpciu alebo o adhéziu, kedy sa jedná o interakcie medzi živými systémami. Práve vďaka týmto javom sa v oblasti medzifázového rozhrania zvyšuje koncentrácia látok. Jedným z veľkého radu príkladov pozitívneho vplyvu adhézie patrí adhézia v gastrointestinálnom trakte (GIT).

V prípade adsorpcie v GIT ide o interakcie medzi povrchovou vrstvou traktu a baktériami, ktoré sa v GIT nachádzajú. Pribúdajúce štúdie dokazujú, že tieto mikroorganizmy tvoria spolu s tkanivom symbiotický vzťah. Tkanivo intestinálneho traktu pokryté vrstvou hlienu zabezpečuje vhodné podmienky pre rast a množenie týchto mikroorganizmov. Mikroorganizmy zase vytvárajú z nestrávených organických látok z potravy látky, ktoré môžu byť využité ako zdroj energie a podporujú imunitný systém, vďaka uvoľňovaniu rôznych štruktúrnych molekúl a produktov metabolizmu. Toto spojenie je ohrozované množstvom faktorov (napr. zmena pH, prítomnosť patogénov, užívanie antibiotík a iných liečiv, nevhodná strava), ktoré prispievajú k zdravotným ťažkostiam mnohých jedincov. K ochrane ľudského zdravia sú využívané symbiotické mikroorganizmy, ktoré sa vyskytujú v rôznych potravinách a prispievajú tak k vytvoreniu rovnováhy medzi mikroorganizmami predovšetkým v GIT. Existencia týchto mikroorganizmov, ktoré vykazujú priaznivé účinky na ľudské zdravie, je dokázaná v potravinách i ľudských a zvieracích organizmoch. Tieto organizmy sa označujú ako probiotiká.

Pričom charakterizácia druhového zloženia a koncentrácií rôznych baktérií v GIT je cieľom probiotického výskumu. Dôležitou súčasťou výskumu je popis interakcií medzi mikroorganizmom a črevnou sliznicou. Ďalšie výskumy sú zamerané na vzájomné interakcie medzi mikroorganizmami. Na základe výsledkov týchto štúdií sú vyrábané prípravky (infúzie, potraviny či doplnky stravy), obsahujúce špecifické mikroorganizmy, ktoré majú priaznivé a zdravotne nezávadné účinky na organizmus a využívajú sa pri liečbe niektorých ochorení.

Medzi najrozšírenejšie mikrobiálne rody probiotických baktérií, ktorí sú dostupné v rôznych prípravkoch sú *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. Zakladným mechanizmom zapríčiňujúcim priaznivé účinky týchto bakteriálnych rodov je práve už niekoľkokrát zmienená adhézia k intestinálnemu epitelu, ktorá je nasledovaná kolonizáciou tkaniva. Toto tkanivo je pokryté hlienom, ktorého hlavnou zložkou sú mucíny. Tieto zložky hlienu poskytujú ochranu epitelu pred extracelulárnym prostredím a predstavujú hlavnú komponentu pre mikrobiálnu adhéziu. Adhézia probiotických organizmov je veľmi špecifická pre jednotlivé bakteriálne kmene a závisí na mnohých faktoroch, ako je pH, iónová sila, bakteriálny pohyblivosť, viabilita buniek aj. Za priaznivých podmienok vzniká na mucíne vrstva probiotických baktérií, ktoré spolupracujú a majú preto lepšiu životaschopnosť. Probiotické baktérie teda vďaka špecifickým interakciám tvoria kolónie, ktoré sú označované ako bakteriálny biofilm.

A preto je veľmi dôležité štúdium vzniku prvej fázy bakteriálneho biofilmu na vhodný modelový sorpčný materiál, ktorý by najlepšie simuloval *in vivo* sorpčný povrch. Vývoj biofilmu je rovnako ovplyvňovaný množstvom fyzikálnych, chemických i biologických dejov. Hlavnou experimentálnou náplňou práce bolo navrhnutie a optimalizácia sorpčného povrchu imitujúceho gastrointestinálneho traktu (GIT) vhodného pre adhéziu bakteriálneho kmeňa *L. rhamnosus*. Ku charakterizácii adsorpcie buniek na sorpčný povrch bolo dôležitou súčasťou využitie rôznych fyzikálne-chemických metód.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

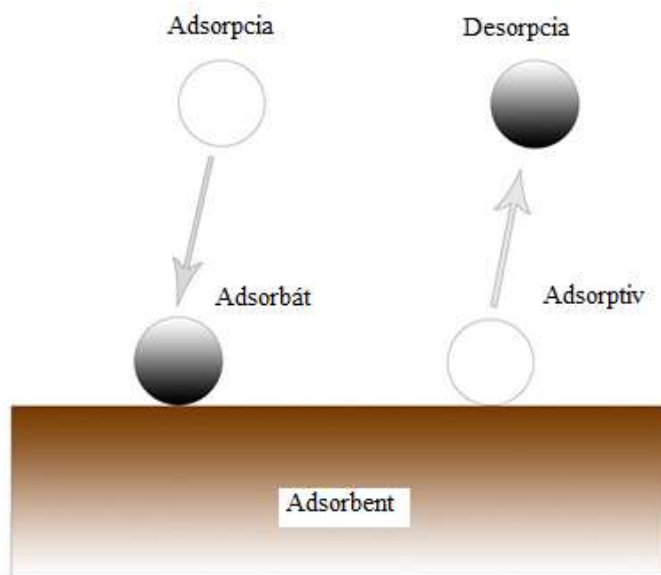
2.1 Fyzikálne-chemické interakcie

Jednotlivé atómy a molekuly látok môžu medzi sebou interagovať prostredníctvom rôznych interakcií fyzikálneho alebo chemického charakteru. Fyzikálne-chemické interakcie je tak možné nájsť vo všetkých známych systémoch, kde zodpovedajú za ich stabilitu. Podstata interakcie je tvorená špecifickými chemickými alebo slabými fyzikálnymi väzbami. Všeobecne ide o elektromagnetické interakcie, prostredníctvom ktorých vznikajú viazané systémy. K týmto interakciám dochádza aj na mieste styku dvoch povrchov alebo fáz. V takomto prípade ide o vplyv povrchovej energie na okolie danej látky. Týmto javom sú spôsobované interakcie ako adhézia či adsorpcia popísané nižšie v kapitolách 2.1.1 a 2.1.2 [1, 2, 3].

2.1.1 Adsorpcia

Ako už bolo zmienené, medzi jednotlivými povrchmi a fázami dochádza k medzimolekulárnym interakciám. Tieto interakcie sú zodpovedné za charakteristické vlastnosti látok. Jedným z týchto javov je adsorpcia. Jedná sa o jav, pri ktorom sú atómy a molekuly viazané na fázovom rozhraní dvoch fáz vďaka pôsobeniu medzimolekulárných síl. Vzhľadom k nesymetrickému pôsobeniu medzimolekulárných síl na povrchové vrstvy je rozhranie dvoch fáz silovo nevyvážené. V prípade, že je aspoň jedna z týchto susedných fáz mobilná (plynná alebo kvapalná), dochádza dôsledkom adsorpcie ku koncentračnej zmene látky v oblasti rozhrania. Za adsorpciu sa zvyčajne považuje pozitívna adsorpcia, kedy sa v oblasti rozhrania samovoľne zvyšuje koncentrácia látky a tým pádom sa koncentrácia tejto látky znižuje v objemovej fáze. Pri tomto deji dochádza k znižovaniu medzifázovej energie. Adsorpcia sa rozlišuje podľa zloženia fázového rozhrania na adsorpciu na pohyblivom rozhraní a na adsorpciu na tuhom rozhraní. Pohyblivé rozhranie môže byť tvorené medzifázou kvapalná-plynná látka alebo dvomi vzájomne nemiešateľnými kvapalnými látkami. Adsorpciou na tuhom fázovom rozhraní je označované rozhranie vzniknuté medzi kvapalnou a pevnou látkou, poprípade plynnou a pevnou látkou. Najčastejšie využívaným príkladom adsorpcie je adsorpcia na tuhom fázovom rozhraní. Zatiaľ čo označenie desorpcia sa využíva v prípade, ak sa na fázovom rozhraní znižuje koncentrácia látky a ide teda o negatívnu adsorpciu [1, 2, 3].

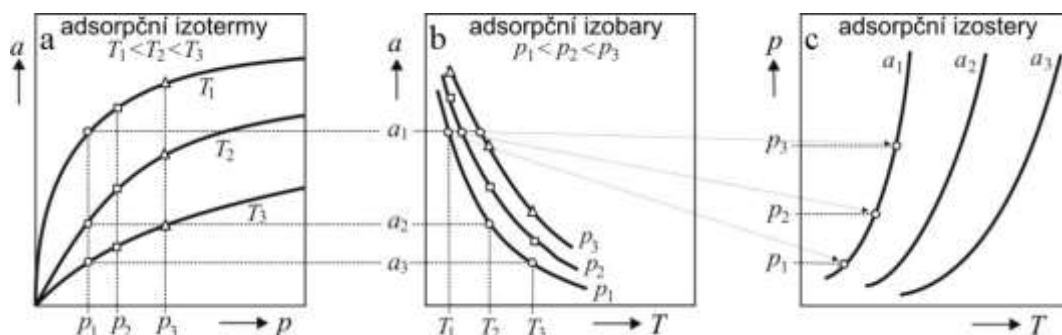
Ako je vidieť na obrázku 1, adsorbát je látka adsorbovaná z mobilnej fázy. Termín adsorbent označuje tuhú fázu, na ktorej k adsorpcii dochádza. Všetky látky schopné adsorpcie na akýkoľvek sorbent sú označované termínom adsorptíva. Pri štúdiu biochemických interakcií za prítomnosti živých systémov sa adsorpcia často nahrádza pojmom adhézia. Pri tomto deji dochádza pôsobením príťažlivých síl k priľnavosti medzi molekulami alebo atómami a tuhým povrchom [1, 4].



Obrázok 1: Definícia adsorpcie

Ako už bolo zmienené vyššie, pojmom adsorpcia sa označuje jav kedy sú atómy alebo molekuly na medzifázovom rozhraní viazané pôsobením medzimolekulárnych síl. Adsorpcia je teda charakterizovaná pomocou vzájomnej závislosti medzi adsorbovaným množstvom látky, jej parciálnym tlakom a teplotou. Najčastejšie sa adsorbované množstvo látky vyjadruje v moloch. V niektorých prípadoch býva táto premenná vyjadrená aj v jednotkách hmotnosti či pomocou objemu naadsorbovanej substancie. Z dôvodu náročnosti stanovenia povrchu sorbentu sa táto veličina vždy prepočítava na hmotnosť použitého sorbentu. Pričom všeobecne býva adsorpcia účinnejšia pri použití nižšej teploty, keďže je sorpcia sprevádzaná exotermickou reakciou. V dôsledku toho, pri zachytení častíc na povrch sorbentu dochádza k premene kinetickej energie týchto častíc na teplo. Určité množstvo tepla vzniká taktiež v priebehu úbytku voľných väzbových miest na povrchu sorbentu [3, 4].

Adsorpčná rovnováha sa pri adsorpcii ustanovuje na rozhraní medzi adsorpčným filmom a druhou fázou (kvapalina/plyn). Rovnovážne množstvo naadsorbovanej látky (relatívna adsorpcia) môže byť pri konštantnej teplote úmerné tlaku plynu alebo koncentrácii v prípade, že sa adsorpcia vykonáva z roztoku. Táto závislosť je označovaná termínom adsorpčná izoterma a je najčastejšie používaná pre charakterizáciu adsorpcie (obrázok 2a). Pre charakterizáciu adsorbovaného množstva sa tiež experimentálne stanovujú adsorpčné izobary (obrázok 2b), ktoré vyjadrujú závislosť adsorbovaného množstva na teplote pri konštantnom tlaku alebo adsorpčné izostéry (obrázok 2c) vyjadrujúce teplotnú závislosť rovnovážneho tlaku plynu adsorbujúceho sa na pevnom sorbente pri konštantnom adsorbovanom množstve [1, 3, 4].



Obrázok 2: Grafické znázornenie; a) adsorpčné izotermy, b) adsorpčné izobary, c) adsorpčné izostéry [3]

Pre charakterizáciu adsorbovaného množstva na teplote za konštantného tlaku pre fázové rozhrania tvorené medzi plynom a pevnou látkou alebo kvapalinou a pevnou látkou sa najčastejšie využíva

Freundlichova, Langmuirova a BET (Brunauer, Emmet a Teller) izoterma. Hodnoty konštant pre tieto izotermy je nutné stanoviť experimentálne. Pri charakterizácii adsorpcie sa tiež používa základná Gibbsova adsorpčná izoterma, ktorá je v základnom tvare platná pre všetky fázové rozhrania:

$$\Gamma = -\frac{c}{R \cdot T} \cdot \frac{d\gamma}{dc}, \quad 1$$

kedy c vyjadruje koncentráciu látky v celom objeme, R je univerzálna plynová konštanta, T teplota, γ povrchové napätie roztoku a Γ relatívna adsorpcia [1, 3].

Pre pozitívnu adsorpciu platí tiež empirická Szyszkowského rovnica popisujúca závislosť povrchového napätia vodných roztokov organických látok na koncentrácii:

$$\gamma = \gamma_0 - a \cdot \log(1 + b \cdot c), \quad 2$$

kde c je opäť koncentrácia látky v celom objeme, γ_0 je povrchové napätie čistého rozpúšťadla, γ je povrchové napätie roztoku a a , b sú empirické konštanty [3].

Kombináciou základného tvaru Gibbsovej adsorpčnej izotermy a empirickou Szyszkowského rovnice získavame konečný tvar Gibbsovej rovnice [3]:

$$\Gamma = \frac{a}{2,303 \cdot R \cdot T} \cdot \frac{b \cdot c}{1 + b \cdot c}. \quad 3$$

2.1.1.1 Druhy adsorpcie

Adsorpciu je možné deliť podľa druhu medzimolekulárnych síl najčastejšie na dva typy a to konkrétne na fyzikálnu adsorpciu a chemiadsorpciu. K fyzikálnej adsorpcii, označovanej aj ako van der Waalsova adsorpcia, dochádza vplyvom fyzikálnych nekovalentných interakcií medzi adsorbátom a adsorbentom. Zatiaľ čo u chemisorpcii teda chemickej adsorpcii dochádza k tomu, že sa molekuly adsorbátu viažu chemickou väzbou, najmä kovalentnými interakciami k povrchu sorbentu [1].

Fyzikálnu adsorpciu zapríčiňujú relatívne slabé sily, ktoré sú často vratné z dôvodu nízkych aktivačných energií. Ide o dynamické interakcie, ktoré sú prítomné u všetkých druhoch častíc umožňujúce viacvrstvú adsorpciu tým, že sa na vytvorenom adsorpčnom filme vytvorí ďalšia vrstva pomocou fyzikálnych síl. Fyzikálna adsorpcia nie je špecifická a môže pôsobiť na celom povrchu adsorbentu. Vo fázovom rozhraní kvapalina-pevná látka dochádza vďaka fyzisorpcii k tzv. molekulárnej adsorpcii. V princípe ide o zachytenie celých molekúl prípadne o zachytávanie oboch druhov iónov v elektrolyte v rovnakom rozsahu. Meranie tejto adsorpcie prebieha pri ustanovení adsorbčnej rovnováhy, kedy dochádza k detekcii zmeny koncentrácie látky v roztoku. Medzi interakcie spôsobujúce fyzisorpciu patria elektrostatické interakcie, vodíkové mostíky, van der Waalove interakcie a hydrofóbny efekt. Tieto interakcie sú bližšie popísané nižšie [1, 3, 5].

Elektrostatické interakcie sa riadia Coulombovým zákonom. Energia týchto interakcií je závislá na veľkosti nábojov a permitivite prostredia. Ide o odpudzujúce alebo príťažlivé interakcie nábojov alebo permanentných dipólov, ktoré sú predovšetkým stredného až ďalekého dosahu. Sila elektrostatických interakcií klesá s druhou odmocninou ich vzdialenosti. Ide o najsilnejšie nekovalentné interakcie [5, 6].

Vodíkové väzby sú interakcie vznikajúce medzi elektronegatívnymi atómami. Väzba vzniká medzi donormom vodíku a akceptorom s voľným elektrónovým párom. Dôležitú úlohu majú elektrostatické interakcie umožňujúce vznik vodíkového mostíka [5, 6].

Van der Waalove interakcie sú interakcie veľmi krátkeho dosahu a slabej intenzity. Kumuláciou mnohých van der Waalsových interakcií však môžu mať ďaleký rozsah (napr. u veľkých molekúl, u koloidných častíc). Ich podstata je závislá na elektrostatickom príťahovaní a odpudzovaní. Jedná sa o nekovalentné interakcie, ktoré nie sú spôsobené vodíkovými mostíkmi, elektrostatickými interakciami ani hydrofóbnym efektom [5].

Hydrofóbny efekt umožňuje zhlukovanie molekúl vo vodnom roztoku. Z entalpického hľadiska sa jedná o van der Waalsove interakcie medzi nepolárnymi molekulami. Prevládajúcu úlohu má však entropia, ktorá pri hydrofóbnom efekte vzrastá, pretože v oblasti hydrofóbnych skupín sa molekuly vody oddeľujú od nepolárnych molekúl späť do vodného prostredia. Efekt vykazuje stredne ďaleký rozsah [5].

Chemická adsorpcia je špecifická interakcia pôsobiaca na povrchu adsorbentu na určitom mieste tzv. aktívnom mieste, ktoré umožňuje vytvorenie chemickej (kovalentnej) väzby. Ide o sily veľmi krátkeho dosahu, ktoré sú však silnejšie ako nekovalentné interakcie spôsobujúce fyzikálnu adsorpciu. Chemisorpcia neumožňuje vytvorenie viacvrstvého filmu, ale po vytvorení monovrstvy sa môžu vytvoriť na základnej vrstve ďalšie pomocou fyzikálnej sorpcie [1, 3].

2.1.2 Adhézia

Na rozdiel od adsorpcie, adhézia zahŕňa príťažlivé sily chemického a fyzikálneho charakteru pôsobiace na styku povrchov dvoch telies nadmolekulárnej úrovne. Táto príťažlivosť môže byť spôsobená mechanickými alebo špecifickými interakciami. Mechanická adhézia je spôsobená nerovnosťou styčnej plochy, zatiaľ čo špecifické interakcie sú zapríčinené fyzikálnymi alebo chemickými väzbami. Fyzikálna adhézia je analogický k adsorpcii spôsobená slabými medzimolekulárnymi silami, medzi ktoré patria Van der Waalsove sily, vodíkové mostíky atď. Naopak chemická adhézia je zapríčinená silnejšími väzbami, ktoré sú kovalentné, iónové alebo kovové [1, 2].

2.1.2.1 Mikrobiálna adhézia

V rámci adhézie je dôležitou témou takzvaná mikrobiálna adhézia, kedy planktonické bunky prilnú k abiotickému alebo biotickému povrchu substrátu, vďaka ktorej dochádza k agregáčnym a kolonizačným procesom a tvorbe zložitej kolónie tzv. biofilmu. Prvá fáza adhézie je pravdepodobne zapríčinená vratnými fyzikálnymi interakciami, ktoré znižujú medzifázovú energiu spolu s chemickými interakciami na rozmedzí planktonickej bunky a substrátu. Biologický popis adhézie spôsobujúci nevratné a trvalé pripútanie k povrchu substrátu prostredníctvom špecifických interakcií, ktorý vyžaduje často niekoľkohodinovú inkubáciu, sa označuje ako sekundárna fáza. Pre abiotické a biotické povrchy platí odlišná fyzikálne-chemická charakteristika primárnej fázy ale vždy je pre úspešnú adhéziu dôležitá, aby sa planktonické baktérie dostali do dostatočného kontaktu so substrátom. Keď sa baktérie dostatočne priblížia k povrchu substrátu, začnú pôsobiť ako chemické interakcie tak aj fyzikálne sily zahŕňajúce statické interakcie, hydrofóbny efekt, van der Waalsove interakcie a elektrostatické interakcie. Elektrostatické interakcie pravdepodobne vykazujú najmä odpudivé sily, vzhľadom k tomu, že baktérie i väčšina substrátov, v závislosti na podmienkach, vykazujú záporný náboj [7, 8, 9].

Adhéziu na povrch je možné tiež kvantifikovať ako počet buniek pripojených k povrchu substrátu po premytí, kedy dochádza k odstraňovaniu nenaviazaných buniek. Táto experimentálna metóda je časovo závislá a už sa nevyužíva. V súčasnosti sú používané systémy, kedy sa pomocou on-line mikroskopickej detekcie zachytáva rýchlosť adsorpcie a desorpcie. Ani tieto experimenty pre popis mikrobiálnej adhézie nie sú dostatočné, keďže sa pomocou danej metódy skúma systém tvorený jediným bakteriálnym kmeňom. V reálnych živých systémoch však pokrýva povrch substrátu celý rad rôznych vzájomne komunikujúcich baktérií. Jeden bakteriálny kmeň s veľkou pravdepodobnosťou ovplyvňuje prítomnosť iných bakteriálnych buniek na povrchu, čo sa označuje ako koadhézia. Preto v prípade, že takéto baktérie nemajú vo svojej blízkosti baktériu, ktorá obvykle zabezpečuje ich prilnutie k povrchu, čo spôsobuje, že v experimentoch nemusí byť adhézia buniek k povrchu merateľná alebo je ich adhézia k povrchu výrazne menšia ako je v reálnom systéme, kde sa nachádzajú aj „pomocné“ baktérie [7].

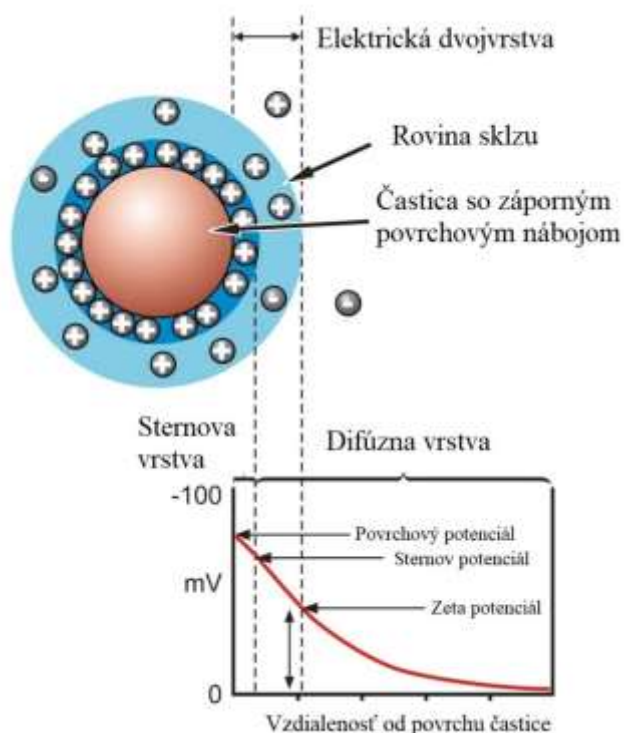
Primárna fáza mikrobiálnej adhézie môže byť charakterizovaná dvomi základnými prístupmi, a to termodynamickým prístupom a teóriou DLVO. Termodynamický prístup využíva meranie kontaktných uhlov medzi fázovými rozhraniami k získaniu interakčnej energie. Z nameraných uhlov sa prepočtom dá získať veľkosť medzifázovej energie študovaného povrchu. Tento spôsob umožňuje určiť, či je primárna mikrobiálna adhézia energeticky výhodná alebo nie. Nevýhoda daného postupu spočíva v tom,

že táto teória vznikla pôvodne na charakterizáciu povrchových vlastností pevných látok makroskopických rozmerov. Keď je táto metóda využívaná k štúdiu mikroskopických útvarov, nie je možné zohľadniť variabilitu mikroskopických buniek. Táto teória tiež nezahŕňa príspevok elektrostatických síl medzi bunkou a sorbentom a jednotlivými bunkami. Na rozdiel od toho, DLVO teória zohľadňuje pôsobenie elektrostatických síl na rozhraní bunky a sorbentu, viac o tejto teórii pojednáva nasledujúca kapitola 2.1.2.2 [8].

2.1.2.2 DLVO teória

Ako už bolo zmienené v predchádzajúcej kapitole, DLVO teória zohľadňuje pri popise mikrobiálnej adhézie elektrostatické interakcie pôsobiace na rozhraní medzi bunkou a sorbentom. Jedná sa o teóriu pôvodne odvodenú pre popis stability koloidných disperzií, a to konkrétne v roku 1940 ruskými autormi Derjaguinom a Landauom a holandskými chemikmi Verweyom a Overbeekom. Táto teória predpokladá, že každá častica na svojom povrchu disponuje elektrickým nábojom. Z obrázku 3 je zrejmé, že v okolí záporne nabitého povrchu sa hromadia kladne nabité ióny z roztoku a tým vzniká nepohyblivá pevne viazaná Sternova vrstva. K tejto vrstve prilieha difúzna vrstva s mobilnými iónmi, ktoré už nie sú pripojené tak pevne. Pomyselnú hranicu tvorí medza sklzu, kde sa ióny vo vnútri difúznej vrstvy pohybujú s časticou a ióny za hranicou difúznej vrstvy sa pohybujú nezávisle na častici. Na hranici týchto vrstiev vzniká elektrokinetický potenciál tzv. zeta-potenciál (ζ -potenciál), ktorý určuje potenciál medzi vonkajším prostredím kvapaliny a povrchom častice (v difúznej vrstve) poskytujúci informáciu o potenciálnej stabilite koloidného systému. Znamienko ζ -potenciálu je opačné ako vrstva iónov vyskytujúcich sa v elektrokinetickej dvojvrstve, čím udáva presný údaj o povrchovom náboji častice [7, 8, 10, 11].

Ako bolo spomenuté v predchádzajúcom odstavci, vďaka elektrostatickým interakciám v okolí nabitých častíc dochádza k vytvoreniu elektrickej dvojvrstvy. Túto vrstvu ovplyvňuje hodnota pH a iónová sila roztoku elektrolytu. Pri vyšších koncentráciách elektrolytu v rozmedzí od 0,1 do 0,2 M klesá hrúbka elektrickej dvojvrstvy, čo uľahčuje integráciu medzi povrchmi a dochádza k zvýšeniu bakteriálnej adhézie. Hranica koagulácie závisí na povahe systému a je určená ζ -potenciálom približne v rozmedzí od 25 mV do 30 mV. Zeta potenciál je ovplyvnený najmä hodnotou pH elektrolytu. V prípade, keď častice získavajú záporný ζ -potenciál a do systému je pridávaný alkalický roztok, záporný náboj sa zväčšuje. Opačný prípad, kedy je do systému plynule dodávaný elektrolyt s nízkym pH, má za následok znižovanie záporného náboja až do úplnej neutralizácie. Po ďalšom pridaní kyseliny nadobudne ζ -potenciál kladnú hodnotu. Bod, kedy pH roztoku zapríčiňuje nulovú hodnotu ζ -potenciálu (celkový náboj rovný nule) sa nazýva izoelektrický bod. Izoelektrický bod je dôležitý pre charakterizáciu systému, keďže v závislosti na jeho hodnote častice v roztokoch o rôznom pH vykazujú odlišný povrchový náboj [7, 8, 10, 11].



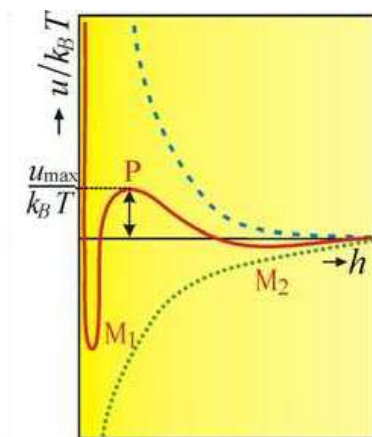
Obrázok 3: Štruktúra elektrickej dvojvrstvy [12]

Celková energia adhézie ($\Delta_{adh}G^{tot}$) daná vzdialenosťami povrchov mikrobiálnych buniek vo vodnom prostredí je vyjadrená sumou síl elektrickej dvojvrstvy a príťažlivých van der Waalsových síl:

$$\Delta_{adh}G_{DLVO}^{tot}(d) = \Delta G^{EL}(d) + \Delta G^{LW}(d), \quad 4$$

kedy ΔG^{EL} je príspevok elektrostatickej interakčnej energie a ΔG^{LW} príspevok Londonovej-van der Waalsovej interakčnej energie [8].

V dôsledku DLVO teórie po styku dvoch častíc nesúcich rovnako nabitie ióny v prekrývajúcich sa elektrických dvojvrstvách prevládajú odpudivé sily a častice nekoagulujú. Obrázok 4 popisuje priebeh závislosti interakčnej energie na vzdialenosti častíc. Interakčná energia je daná súčtom odpudivých elektrostatických síl s príťažlivými Londonovými silami. Krivka je charakterizovaná hlbokým minimom pre veľmi malé vzdialenosti, kedy sú príťažlivé sily medzi časticami maximálne a vznikajú agregované častice. Pri strednej hodnote vzdialenosti sa objavuje maximum, ktorého výška závisí na koncentrácii elektrolytu v disperznom prostredí. Tieto maximá predstavujú energetické bariéry, ktoré musia dve častice prekonať aby sa dostali do najstabilnejšej konfigurácie [3, 7, 8].



Obrázok 4: Závislosť integračnej energie na vzdialenosti medzi časticami [3]

Táto teória môže byť využitá ako alternatívny prístup pre vysvetlenie a popis mikrobiálnej adhézie s využitím informácií o elektrostatických interakciách pôsobiacich medzi povrchom a baktériami, keďže mikrobiálne bunky obsahujú iónogénne skupiny nesúce pri fyziologických podmienkach celkový záporný náboj. Okrem elektrostatických interakcií ovplyvňujú mikrobiálnu adhéziu aj iné interakcie, čo spôsobilo rozšírenie DLVO teórie [7, 8].

2.1.2.3 Rozšírená XDLVO teória

Oba spomínané prístupy, ako termodynamický tak DLVO teória, vychádzajú z predpokladu, že sa interakcie vyskytujú medzi hladkými, rigidnými a homogénnymi časticami, čo ale u reálnych živých bunkách neplatí. Do problematiky popisu mikrobiálnej adhézie boli postupne zaraďované ďalšie interakcie. Klasická DLVO teória bola preto rozšírená o Lewisove acidobazické interakcie, ktoré zahŕňajú hydrofilný a hydrofóbny efekt a osmotické interakcie s krátkym dosahom, ktoré sú ale v prípade štúdia mikrobiálnych buniek zanedbávané. V závislosti na vzdialenosti sa celková interakčná energia adhézie ($\Delta_{adh}G^{tot}$) medzi dvomi povrchmi vyjadruje vzťahom:

$$\Delta_{adh}G_{XDLVO}^{tot}(d) = \Delta G^{EL}(d) + \Delta G^{LW}(d) + \Delta G^{AB}(d), \quad 5$$

kde ΔG^{AB} predstavuje príspevok hydrofóbného efektu [7, 8, 11].

Miera hydrofobicity bunkového povrchu závisí na prítomnosti brv, fimbrií, pilusov, povrchových sacharidov a proteínov. Podľa počtu hydrofóbných domén na povrchu buniek môžu byť hydrofóbne interakcie až 100× silnejšie oproti van der Waalovým silám alebo elektrostatickému odpudzovaniu, preto nemôžu byť hydrofóbne interakcie pri charakterizácii mikrobiálnej adhézie zanedbané [9, 13].

2.2 Biologický povrch

Biologický povrch predstavuje rozhranie medzi syntetickými materiálmi a biologickým prostredím, kde dochádza k vytvoreniu biofunkčných plôch. Tieto povrchy sa prezentujú najmä ako lekárske implantáty v ľudskom tele, rôzne biosenzory a biočipy určené pre diagnostiku, tkanivové inžinierstvo, bioelektroniku či umelú fotosyntézu. Na rozmedzí povrchov a biologických zložiek dochádza k ich vzájomnej interakcii, ktorá je predmetom intenzívneho skúmania [14].

Ako modelové biologické systémy sa využívajú kvapalné prostredia vytvárajúce sa v okolí buniek a živého tkaniva, ktorých povrch sa skladá z bielkovín a biomembrán obsahujúcich aminokyseliny, nukleové kyseliny a fosfolipidy. Pri vedeckej práci dochádza k štúdiu štruktúry, spájania, dynamiky a kinetiky biomolekúl na povrchoch alebo sa štúdium zaoberá tvorbou biofunkčných povrchov, ktoré sú schopné podieľať sa na komunikačnom systéme buniek a tkaniva [14].

2.2.1 Modelový biologický povrch

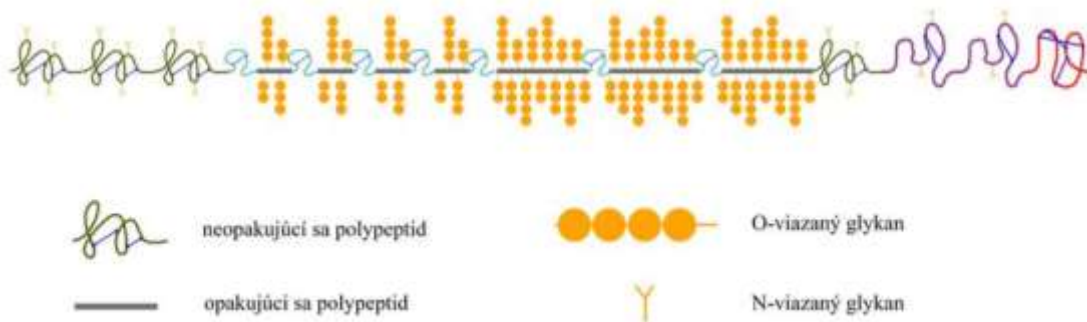
Biologické povrchy zabezpečujú priebeh najrôznejších interakcií. Biologický povrch, ktorý sa vyskytuje na slizniciach čriev poskytuje interakcie medzi hostiteľom, mikroflórou a živinami. Gastrointestinálny trakt je pokrytý vrstvou hlienu, ktorého úlohou je ochrana podkladovej sliznice a tvorí rozhranie medzi epiteliálnym povrchom a mimotelovým prostredím. Tento hlien sa nazýva mukus a je tvorený vodou a glykoproteínami tzv. mucínmi. V tejto bakalárskej práci bol mucín zvolený ako modelový biologický povrch a ďalej o ňom pojednája kapitola 2.2.1.1 [15, 16].

2.2.1.1 Mucín

Pojem mucín je označenie širokej skupiny glykoproteínov, ktoré sú súčasťou cytoplazmatickej membrány i extracelulárnej matrix buniek. Ich vysoká koncentrácia sa nachádza na slizniciach gastrointestinálneho traktu (GIT) a v slinách, kde majú ochrannú funkciu pred mechanickým poškodením alebo vstupom škodlivých látok do epitelového tkaniva. Z biofyzikálneho hľadiska ide o látku, ktorá je zodpovedná za viskoelastické vlastnosti hlienového gélu GIT [15, 16].

Štruktúra mucínu (obrázok 5) je tvorená z O-viazaných glukánov zastúpených v molekule mucínu v 50-90% pripojených na hlavnom bielkovinovom reťazci (apomucín). Práve glykany spôsobujú veľké

molekulárne hmotnosti mucínu v rozmedzí 0,5-20 MDa. Zloženie tohto extracelulárneho glykoproteínu pozostáva z 80 % N-acetylglaktosaminu, N-acetylglukosaminu, fruktózy, galaktózy, kyseliny sialovej (N-acetylneuraminová kyselina) a malého obsahu mannózy a síranu. Pri tvorbe mucínu vznikajú oligosacharidové reťazce skladajúce sa z 5 až 15 monomérov pripojených k základu mierne vetviacej sa bielkoviny. Behom biosyntézy mucínu v Golgiho aparáte je k aminokyselinovej sekvencii polypeptidu naväzované veľké množstvo O-viazaných sacharidových reťazcov. Toto spojenie zabezpečuje N-acetylglaktosamin pripojený k hydroxylovej skupine serinových alebo threoninových zvyškov prostredníctvom O-glykosidickej väzby. Následne sú k N-acetylglaktosaminu pripojované molekuly galaktosy alebo N-acetylglukosaminové zvyšky, vďaka ktorým vznikajú rôzne jadrové štruktúry. Glykany tvoria približne 80 % glykoproteinového reťazca mucínu a zvyšných 20 % je tvorených proteinovým jadrom. Táto časť je tvorená proteínami o molekulovej hmotnosti pohybujúcej sa v rozmedzí 200-500 kDa usporiadaných v odlišných častiach reťazca. V prvej časti mucínového reťazca sa nachádza N-terminálny signálny peptid zahŕňajúci karboxylové a amino-terminály, ktoré bývajú niekedy rozptýlené do časti STP-domén (charakteristické opakovanie reťazca mucínu, s malým množstvom sacharidov a vysokým podielom aminokyselín). Charakteristické opakovanie nazývajúce sa STP-domény tvoria z viac ako 60 % aminokyseliny serin, threonin, a prolin. Ide o oblasť so zníženým množstvom sacharidov naviazaných na reťazci. STP časti umožňujú vysoký stupeň heterogenity mucínu vzhľadom na variabilné množstvo tandemových opakovaní. Práve táto charakteristická vláknitá časť proteinu s oligosacharidmi vyčnievajúcimi z reťazca vedie vzniku typického vzhľadu mucínu. Dôležitú oblasť tvorí signálny peptid potrebný k cieleniu peptidu k endoplazmatickému retikulu prostredníctvom extracelulárnej sekrécie alebo vložení nasyntetizovaného mucínu do bunkovej membrány. V ďalšej oblasti sa nachádza centrálna glykosylovaná oblasť, ktorá koncentruje O-glykosyláciu a nachádza sa v nej veľké množstvo tandemových opakovaní [15-18].



Obrázok 5: Schematické znázornenie molekuly mucínu

Mucínu môžu byť v závislosti na zložení sacharidov rozdelené biologicky a histochemicky na neutrálne alebo na kyselé mucíny. Mucíny, ktoré sa označujú ako kyselé obsahujú významné množstvo sialovej kyseliny („sialomicíny“) alebo zvyšky síranov („sulfomucíny“) vykazujúce silný negatívny náboj na povrchu molekuly mucínu. Väčšina mucínov vo svojej štruktúre obsahuje aspoň niektoré z negatívne nabitých skupín. Existujú mucíny, ktoré obsahujú sulfátové skupiny a zároveň zvyšky sialovej kyseliny a ich pomenovanie potom naznačuje, ktoré negatívne nabité skupiny prevažujú (sialo/sulfo) [15-17].

Ako už bolo spomenuté vyššie, mucín tvorí hlien (mucus) v gastrointestinálnom trakte. Zloženie tohto hlienu nie je rovnaké na povrchu všetkých častí GIT ale je tvorený rôznymi gélovými formami mucínu. Mucus v tenkom a hrubom čreve človeka je tvorený prevažne z mucínu označujúceho sa ako MUC2 génom, ktorý sa skladá prevažne z glykoproteínov, na rozdiel od hlienu povrchu žalúdka obsahujúceho hlavne MUC5AC gen. Tieto štrukturálne domény sa vzájomne podobajú ale nie sú v každom ohľade totožné. Sekrečné mucíny obsahujúce sekvencie bohaté na cystein v C- a N-koncových oblastiach tvoria intra- a intermolekulárne disulfidické väzby, ktoré ovplyvňujú vznik slizničnej vrstvy a sú tiež zodpovedné za charakteristické viskoelastické vlastnosti. Ďalšiu skupinu tvoria membránové mucíny viazané na membránu a vstupujúce do glykokalyxu slizničného povrchu. Membránové mucíny

sprostredkovávajú dôležitú biologickú interakciu bunka-bunka a bunka-matrix a navyše sú súčasťou bunkovej signalizácie. Po vylúčení týchto mucínov z povrchu a ich následnej interakcií vo vrstve hlienu sú schopné ovplyvniť viskozitu ochrannej vrstvy. Vylúčené mucíny tvoria hlavnú štruktúrnú zložku hlienového gélu [16] [19] .

2.3 Bakteriálny biofilm

V gastrointestinálnom trakte sa nachádzajú pohárikovité bunky, ktoré exprimujú mucín. Mucín následne tvorí slizničný povrch čriev, ktorý je veľmi dôležitý pri ochrane hostiteľa ako bolo spomínané v kapitole 2.2.1. Takto vytvorená vrstva je počiatočným bodom kontaktu medzi hostiteľskými bunkami a intestinálnymi mikróbmami. Taktiež sa jedná o obrannú líniu proti patogénnym baktériám a značne spolupracuje s probiotickými baktériami.. Probiotické baktérie majú priaznivý vplyv na GIT. Probiotické baktérie produkujú napríklad vitamíny, ktoré modulujú mikrobiótu GIT. Lactobacily zvyšujú expresiu mucínu, čím dochádza k blokovaniu patogenézie je zvyšovaná bariérová funkcia. Vďaka vhodným podmienkam vytvárajú tieto probiotické baktérie na povrchu mucínu kolónie a vytvárajú bakteriálny biofilm. [20].

Prvé zmienky o biofilme pochádzajú už z 17. storočia kedy van Leeuwenhoek pozoroval a charakterizoval biofilm na vlastných zuboch. Najnovšia mikrobiálna definícia biofilmu vyšla v roku 2002: „Biofilm zahŕňa spoločenstvo charakterizované bunkami, ktoré sú nevratne pripojené k substrátu alebo rozhraniu, prípadne vzájomne k sebe (jednodruhová a viacdruhové spoločenstvá) a sú obalené v tzv. extracelulárnej alebo mimobunkovej matrici, pozostávajúcej zo zlúčenín, ktoré si bunky samy produkujú a vykazujú zmenu fenotypu vzhľadom k rýchlosti rastu a transkripcií génu.“ Biofilm je komunita navzájom komunikujúcich baktérií, ktoré sú na sebe aspoň čiastočne závislé. Baktérie nachádzajúce sa vo forme biofilmu vo všeobecnosti vykazujú väčšiu odolnosť voči kyselému prostrediu, antibiotikám, vysokým teplotám a mechanickému poškodeniu, než baktérie, ktoré nie sú súčasťou biofilmu [21]

2.3.1 Charakteristika biofilmu

Biofilm je tvorený bunkami imobilizovanými na povrchu substrátu. Môže sa tvoriť na rôznych abiotických i biotických povrchoch, ktoré sú často mikrobiálne organické polymérne matrice. Bakteriálne bunky sa hromadia na rozhraní pevného povrchu a kvapalnej látky a sú ohraničené v matrici vysoko hydratovaných extracelulárnych polymérnych látok (EPS) tvoriacich ich okolie. Zväčša sú týmito látkami polysacharidy, proteíny, nukleové kyseliny a lipidy či iné biopolyméry ako huminové látky, alebo povrchovo aktívne látky. V biofilmoch predstavujú mikroorganizmy menej ako 10% suchej hmotnosti bakteriálnych buniek a viac ako 90% je tvorených matricou zloženou z extracelulárneho materiálu. Funkcia a vlastnosti EPS majú pre vznikajúci biofilm dôležitú úlohu. Extracelulárne polymérne látky produkuje samotný biofilm a ich úlohou je zabránenie vysychaniu biofilmu, ochrana pred vonkajšími vplyvmi ako sú antimikrobiálne látky, zmena pH prostredia, dehydratácia alebo UV žiarenie. Tieto látky tvoria v biofilme trojrozmernú polymérnu sieť spájajúcu a imobilizujúcu bakteriálne bunky biofilmu. [22, 23]

2.3.2 Vznik a vývoj biofilmu

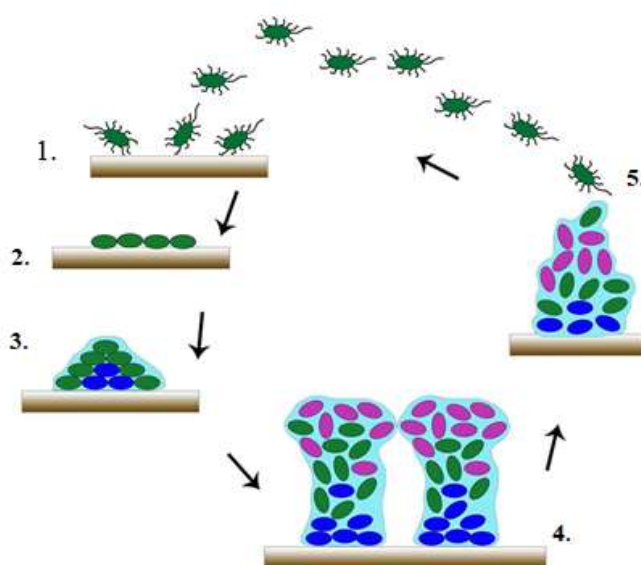
Pomocou mikroskopie bolo pozorované, že rast baktérií prebieha rozličnou rýchlosťou po ich prichytení na povrch než sa začal tvoriť samotný biofilm. Vývoj a rast biofilmu riadia rôzne procesy fyzikálneho, chemického i biologického charakteru. Tieto rozličné mechanizmy zapríčínujú rôzne spôsoby viazania buniek, čím dochádza k vývoju biofilmu. Pri formovaní biofilmu majú dôležitú úlohu priľnavé a súdržné sily. Jedná sa o mechanizmy určujúce kohézne a tzv. lepiace vlastnosti biofilmu [23, 24] .

Tvorenie biofilmu pozostáva z viacerých, na seba naväzujúcich, krokov, ktoré sú zobrazené na obrázku 6. Na začiatku v prvej fázy, dochádza k prichyteniu planktonických buniek k povrchu prostredníctvom procesu povrchového pripojenia (vratná adhézia). Následne v druhej fázy dochádza k nevratnému pripojeniu buniek tzv. nevratnej adhézii. Počas dozrievania, ktorému napomáhajú extracelulárne polymérne látky, tvorí biofilm z buniek štruktúrovanú architektúru. Toto dozrievanie je popísané vo

fázach tri a štyri. Bunky po svojom dozrení, fáza päť, opustia biofilm. Táto fáza sa nazýva fáza rozptýlenia alebo fáza disperzie buniek. Všetky fázy tvorby biofilmu sú vysoko regulované procesy [22, 26].

Fázy tvorby bakteriálneho biofilmu (obrázok 6):

1. V prvom rade dochádza k prichyteniu samostatnej bakteriálnej bunky na povrch substrátu. Ďalšie bunky sa zachycujú nezávisle na prvej, čo je ovplyvnené podmienkami prostredia, v ktorom sa bakteriálne bunky nachádzajú. Prichytením viacerých buniek na podklad vzniká podkladová vrstva, ktorá sa označuje ako klimatizačná a tvorí základ pre rast bakteriálneho biofilmu na povrchu substrátu. Táto vrstva zabezpečuje dostatočný prístup k živinám, ktoré sú potrebné na rast ďalších vrstiev [22, 26].
2. V druhej fáze každá prichytená bakteriálna bunka z klimatickej vrstvy využíva prítomný kyslík a oxid uhličitý, čím sa začínajú jednotlivé bunky rozkladať. Pri rozklade buniek sa na povrchu substrátu produkujú EPS. Vďaka EPS sú bunky udržiavané spolu v jednej komunite a podporujú ďalší rast biofilmu. Bunky v tejto fáze sa nachádzajú v dostatočnej vzdialenosti od seba navzájom, čo spôsobuje, že sa tieto bunky neovplyvňujú a neinteragujú [22, 26].
3. Ďalší rast biofilmu a buniek závisí na čase. Bunky sa vrstvia na seba, čím vzniká mikrokolónia, ktorá sa často označuje ako primárny biofilm. Bunky na povrchu filmu majú dostatočný prístup k potrebným látkam, ktorými sú opäť kyslík a dusík. Metabolizmus buniek, ktoré sa nachádzajú pod povrchovou vrstvou, v dolnej časti mikrokolónie, majú obmedzený prístup k týmto látkam a preto je obmedzené ich difúzia. Reakciou na lokálne zmeny vytvárajú tieto bunky heterogénny fenotyp. Pre bunky baktérií, ktoré sa nachádzajú v matrici, je typický nedostatok Brownovho pohybu, čím štruktúra mikrokolónie mení v ďalšom kroku výstavby biofilmu jeho vzhľad na hubovitý tvar [24, 26].
4. Následne dochádza k postupnej tvorbe vyšších hladín EPS a bunky podporujú rast a tvorbu makrokolónií až na vznik sekundárneho biofilmu. Bunky, ktoré vylučujú EPS a tie, ktoré sa nachádzajú v ich blízkosti podporujú rast biofilmu vo vertikálnom smere vďaka lepšiemu prístupu ku kyslíku a uhlíku. Pri raste buniek do vyšších hladín spôsobuje vystavenie týchto buniek vyšším šmykovým silám [26].
5. Zrelý biofilm vytvárajú spojené zrelé makrokolónie. Vytvorený biofilm sa uvoľňuje do prostredia za účelom kolonizácie ďalších povrchov, ktoré dokončia cyklus rastu bakteriálneho biofilmu [26, 27].

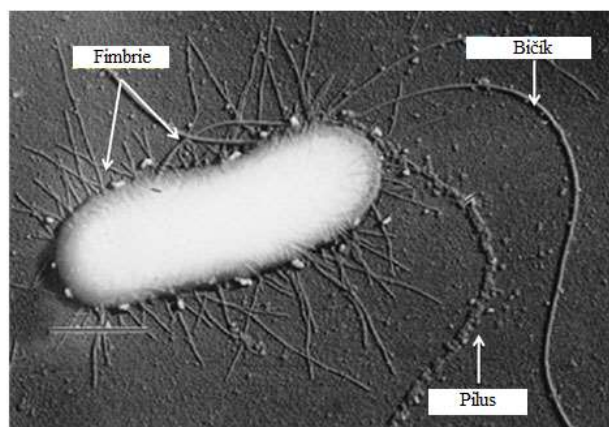


Obrázok 6: Fázy tvorby biofilmu

2.3.3 Modelový mikroorganizmus – rod *Lactobacillus*

Ako bolo spomenuté rod baktérií *Lactobacillus* je súčasťou prirodzenej mikrobioty gastrointestinálneho traktu. Dôležitá schopnosť *Lactobacillus* je tiež ich rast v podobe biofilmu na sliznici, čím sa využívajú ako biofilmové probiotiká. Patrí medzi probiotické baktérie a zahŕňa baktérie mliečneho kvasenia, preto je ich pomenovanie odvodené z latinského výrazu *lac* – mlieko. Probiotické baktérie majú priaznivé účinky na črevnú mikrobiotu. Ich typickou vlastnosťou je schopnosť udržiavať alebo obnoviť rovnováhu črevnej mikrobioty. Jedná sa o živé mikroorganizmy, ktoré pri správnom podávaní poskytujú hostiteľovi zdravotné výhody. K tejto kategórii baktérií sa radia mliečne baktérie tvoriace dlhšie tenké tyčinky, ktoré sú často spojené do retiazok alebo palisád. Ide o nepohyblivé mikroaerofilné alebo fakultatívne anaeróbne, chemoorganotrofné gram-pozitívne baktérie, ktoré netvoria spóry. Optimálne podmienky pre kultiváciu a rast probiotických baktérií sú teplota 37 °C a pH živného média v rozmedzí 6,5-7 (využíva sa tekuté médium Man Rogosa Sharpe (MRS) alebo pevná agarová pôda podľa Rogosy). Kultivovať tieto baktérie je možné aj v prostredí, ktorého hodnota pH je 5, ale pri nižšej hodnote pH sa zastavuje rast baktérií. Vďaka tejto skutočnosti vykazujú lactobacily vyššiu toleranciu na žľožové kyseliny. Najvýznamnejšou schopnosťou probiotických baktérií je skvasovanie hexózových cukrov vrátane laktózy na mliečnu kyselinu. Táto charakteristická schopnosť umožňuje rozdelenie *Lactobacillus* do dvoch skupín. Homofermentatívne druhy mliečneho kvasenia vytvárajú ako hlavný produkt kvasenia len mliečnu kyselinu, zatiaľ čo heterofermentatívne druhy produkujú okrem mliečnej kyseliny v menšom množstve aj etanol, octovú kyselinu a oxid uhličitý [28 - 31].

Keďže patrí medzi gram-pozitívne baktérie, je adhézia tohto rodu na epiteálnom povrchu sprostredkovaná najmä pomocou dvoch pilusových klastrov (obrázok 7). Všeobecne sú gény kódujúce pilusové podjednotky usporadúvané v operóne s aspoň jedným génom pilovo špecifickej sortázy (špecifický enzým, ktorý zabezpečuje vytváranie kovalentných väzieb). *Lactobacillus rhamnosus* GG (kmeň *L. rhamnosus* izolovaný z črevného traktu človeka v roku 1983) obsahuje v genóme gény pre 2 pilusové klastre: SpaCBA a SpaFED. Jednotky pilusov SpaA a SpaD s najväčšou pravdepodobnosťou zabezpečujú základnú kostru pilusu, SpaB a SpaE sú pomocnými drobnými pilusovými podjednotkami a SpaC a SpaF sú umiestnené v celej štruktúre a na špičke pilusu a zodpovedajú za adhezívne vlastnosti pilusu. Najnovšie testy ukazujú, že za adhezívne vlastnosti nesie zodpovednosť aj podjednotka SpaB. Existujú rôzne motívy pilusu, ktoré vznikajú vďaka pôsobeniu špecifickej sortázy. Napríklad isopeptidické väzby vznikajú medzi jednotlivými podjednotkami treonínu LPTXG motívu a lyzínu v YPKN motíve pilusu. Pomocou tzv. „domácej“ sortázy v bunkovej membráne dochádza k rozpoznávaniu LPTXG motívu na piluse a kovalentné naviazanie k peptidoglykanu v ľudskom tkanive. Ako bolo spomenuté vyššie, jednotlivé kmene rovnakého druhu sa trochu líšia v aminokyselinovom zložení pilusov, vďaka čomu môžu vykazovať rôzne kmene odlišne silný adhezívny efekt [32, 33].



Obrázok 7: Štruktúra povrchu probiotickej bunky [34]

2.3.3.1 *Lactobacillus rhamnosus*

Pre túto bakalársku prácu bol vybraný kmeň *Lactobacillus rhamnosus*. Tento kmeň bol pôvodne považovaný ako poddruh *Lactobacillus casei* avšak po jej genetickom výskume bola oddelená ako samostatný druh. Rhamnosus je kmeň označujúcu krátku gram-pozitívnu heterofermentatívnu fakultatívne anaeróbnú baktériu, ktorá sa často objavuje v reťazcoch a využíva sa ako probiotikum. *Lactobacillus rhamnosus* zahŕňa širokú škálu kmeňov izolovaných z rôznych prostredí vrátane gastrointestinálneho traktu. Jednotlivé kmene majú rôzne špecifické génové funkcie potrebné na prispôsobenie sa prostrediu. Celkový genóm týchto baktérií sa skladá z 4711 génov, z čoho jadrový genóm predstavuje 2164 génov z celkového množstva. Zvyšné nejadrové gény kódujú transport a metabolizmus uhlíkovodíkov, extracelulárnych polysacharidov, biosyntézu a produkciu bakteriocínov a produkciu pilusov [35].

3 SÚČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

Štúdiu adsorpcie buniek na biologický povrch, ich, rastu, zloženia a vlastnosťami sa mnoho rokov venuje celosvetová pozornosť. K pochopeniu tejto problematiky sú využívané rôzne analytické metódy. Pre experimenty slúžiace k rozpoznaniu baktérií tvoriacich biofilm a ich extracelulárnej matrix, pri *in vivo* a *in vitro* podmienkach sú používané komerčne dostupné prístrojové techniky a metódy [21].

3.1 Teoretické modely

K základným prístupom využívajúcim sa k charakterizácii prvých fáz biofilmov patrí spomínaný termodynamický prístup spolu s DLVO teóriou. Pomocou týchto metód môže byť kontrolovaný a popísaný stav počiatočného príľnutia buniek na povrchu substrátu. Vytvorený model musí zahŕňať interakcie, ktoré môžu byť pri vzniku bakteriálnej adhézie pozorované danou technikou. Vďaka týmto predpokladom môžu byť experimentálne výsledky overené [39].

V práci autorov *Absolom a spol.* (1983) je pri štúdiu adhézie vybraných bakteriálnych buniek využitý termodynamický prístup. V publikácii je pomocou termodynamických modelov popísaná adhézia viacerých druhov baktérií (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Listeria monocytogenes* a dva kmene *Escherichia coli*) pri kontakte s rôznymi povrchmi ako napr. polyetylén, polystyrén, teflón a iné. Príľnavosť buniek bola určená prostredníctvom obrazovej analýzy pričom bolo zistené, že množstvo baktérií, ktoré podliehajú adhézii na jednotke plochy zodpovedá termodynamickej predpovedi. Tieto údaje preto mohli byť použité k určeniu povrchového napätia rôznych druhov baktérií a toto napätie je zhodné s výsledkami z použitia inej metódy k posúdeniu adhézie [39].

Redman a spol. (2004) sa vo svojej štúdií zamerali na charakterizáciu príľnavosti bakteriálneho kmeňa *Escherichia coli* pri odpudivých elektrostatických podmienkach. K adhézii ako porézne médium použili čistý kremenný piesok z dôvodu minimalizácie heterogénneho efektu náboja. Pri experimente pozorovali prvotnú fázu adhézie buniek, pri ktorej dochádza k vzniku elektrostatickej dvojvrstvy. Vďaka výsledkom dosiahnutým týmto experimentom preukázali opodstatnenie použitia DLVO teórie pri interpretácii výsledkov [39].

3.2 Metódy používané k štúdiu bunkovej adhézie

Pri analýze adhézie mikrobiálnych buniek je dôležitým faktorom samotné zaobchádzanie s baktériami vzhľadom k tomu, že baktérie pri nesprávnych podmienkach prichádzajú o životaschopnosť. V štúdií sa *Pembrey a spol.* (1999) zamerali na nedostatky niektorých techník využívaných pri analýze bunkových povrchov. Pomocou tzv. MATH testov (*Microbial Adhesion to Hydrocarbons*), stanovenia elektroforetickej mobility a stanovenia hydrofóbných hodnôt dospeli k výsledkom, kedy mali bunky vybraných baktérií z tejto štúdie (*Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermis*, *Psychrobacter sp.* kmeň SW8) po použití bežných postupov ako napríklad lyofilizácia, sušenie, vysokorýchlostné odstredovanie či zmena použitého média zmenené fyzikálno-chemické a morfológické vlastnosti. Z tohto dôvodu musia byť pri analýze používané nedeštruktívne techniky, napr. mikroskopia atomárnych síl a prietoková cytometria [40].

Techniky vhodné k štúdiu rôznych vlastností biofilmu vo svojich prácach ponúkajú viacerí autori. Zameriavajú sa na metódy vhodné k charakterizácii rastu biofilmov, vlastnostiam jednotlivých zložiek, životaschopnosti buniek alebo posúdeniu rozsahu a pevnosti adhézie [41 - 44].

K charakterizácii povrchu biofilmu sa využíva skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM), konfokálna laserová skenovacia mikroskopia (CLSM), mikroskopia atomárnych síl (AFM), infračervená spektroskopia (IR), rentgenová spektroskopia (RTG) a nukleárna magnetická rezonancia (NMR). Separačné a spektrometrické techniky môžu byť využité k charakterizácii povrchu i vnútornej štruktúry biofilmu. Medzi používané separačné techniky patrí extrakcia, technika PCR spojená s MALDI-TOF, kapilárna elektroforéza (CE) a mikrosenzory. Ďalšími použitými technikami môžu byť fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH) a atómová absorpčná spektrometria, radiace sa k spektrometrickým technikám,

alebo optická koherentná tomografia (OCT). Popis výhod týchto techník sa nachádza v nasledujúcich tabuľkách 1 a 2 [41 - 44].

Tabuľka 1: Najčastejšie používané techniky k charakterizácii povrchu biofilmu [41 - 44]

Techniky vhodné na charakterizáciu povrchu		
Metóda	Výhody	Nevýhody
Skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM)	vysoké rozlíšenie	nepriístupnosť vnútornej štruktúry biofilmu
Konfokálna laserová skenovacia mikroskopia (CLMS)	monitorovanie štruktúry buniek	vysoké náklady
	in situ	nemožnosť použitia na hrubé biofilmy
	presnosť a jednoduchosť	nízke rozlíšenie
Mikroskopia atomárnych síl (AFM)	vysoké rozlíšenie	žiadne informácie o zložení
	zachytenie biomolekulového správania v reálnom čase	dehydratácia vzorky
Infračervená spektroskopia (IR)	in situ	možná interferencia s vodou v absorpcii IR
Rentgenová spektroskopia (RTG)	in situ	vysoká technická náročnosť
	veľká hĺbková penetrácia	
Nukleárna magnetická rezonancia (NMR)	neinvazívna metóda	nízka citlivosť
		časová náročnosť

Tabuľka 2: Najčastejšie využívané separačné a spektrometrické metódy k charakterizácii biofilmu [41 - 44]

Separačné techniky		
Metóda	Výhody	Nevýhody
Extrakcia	stanovenie sacharidov, proteínov	nízka priepustnosť
		lýza buniek závisí od metódy extrakcie
Techniky PCR v kombinácii s MALDI-TOF	in situ	nedostatok štandardov
	potrebné malá množstvo DNA	obmedzené databázy
		vysoké náklady
Kapilárna elektroforéza (CE)	nízke detekčné limity	náročná príprava vzoriek
		rozklad biofilmu
Mikrosenzory	chemicky inertné	krátka doba životnosti
	stanovenia obsahu glukózy, kyslíka, vápnika, oxidov	znížená citlivosť spôsobená rozmermi senzora
Spektrometrické metódy		
Metóda	Výhody	Nevýhody
Fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH)	in situ	nežiadúce účinky fluorescenčného farbiva
Atómová absorpčná spektrometria (AAS)	nízke detekčné limity	rozklad biofilmu
		časová náročnosť
Ďalšie techniky		
Metóda	Výhody	Nevýhody
Optická koherentná tomografia (OCT)	nedeštruktívna	potrebná kombinácia s CLSM

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Experimentálna časť bakalárskej práce bola zameraná na optimalizáciu metódy prípravy modelového biologického povrchu vhodného na prichytenie baktérie *Lactobacillus rhamnosus*, a tým vytvoriť experimentálny nástroj pre systematické štúdium primárnej fázy vzniku bakteriálneho biofilmu. Dôležitou súčasťou práce bolo aplikovanie rôznych fyzikálne-chemických a analytických metód k stanoveniu adsorpcie buniek na takto pripravený povrch.

4.1 Použité mikroorganizmy, chemikálie a prístroje

4.1.1 Použitý bakteriálny kmeň

Pre experimentálnu prácu bol ako modelový mikroorganizmus vybraný fakultatívne anaeróbny probiotický kmeň baktérie *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825.

4.1.2 Chemikálie

Amberlite XAD-4 (Sigma Aldrich Inc.)

Amberlite IRA-900 chloride form (Sigma Aldrich Inc.)

Deionizovaná voda

Kyselina chlorovodíková (Lach-ner, s.r.o)

Mucín z prasacieho žalúdka Typ II (Sigma-Aldrich)

Media Mikrobiologi *Lactobacillus* MRS Broth (Himedia)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Lach-ner, s.r.o.)

Supelite DAX-8 (Sigma Aldrich Inc.)

4.1.3 Prístroje a zariadenia

Analytické váhy, Boeco (SRN)

Bežné laboratórne sklo a vybavenie

Centrifúga, Hettich EBA 20

FTIR spektrofotometr Nicolet iS50

Laminárny box Aura mini, BioAir – Euroclone

Magnetická miešačka, Kartell, TKO

Minicentrifúga, Sigma 1.14 (SRN)

Modulárny mikrokolorimeter TAM III (TA Instruments, Inc.)

pH-meter 720, inoLab, Merck s.r.o. (NLD)

Programovateľný rotátor typ Multi Bio RS-24

Presné váhy, Kern EW 620-3NM

Skenovací elektrónový mikroskop ZEISS EVO-LS 10

Spektrofotometer HITACHI U-3900H

Vortex TK3S, Kartell spa

Vortex, Heidolph Reax Top

4.2 Uchovávanie vybranej bakteriálnej kultúry

K oživeniu bakteriálnej kolónie bolo využívané médium *Lactobacillus* MRS Broth (MRS) s koncentráciou 55,15 g/l. Príslušné množstvo média navážené na predvážkach bolo v kadičke s objemom 200 ml doplnené na potrebný objem deionizovanou vodou (dH₂O). Rozpúšťanie roztoku bolo uskutočnené pomocou magnetickej miešačky a prevedený do troch 50 ml skúmaviek. Skúmavky boli po dobu 1 hodiny sterilizované v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom. Po ochladení 50 ml centrifugačných skúmaviek na laboratórnu teplotu boli presunuté do sterilizovaného laminárneho boxu, v ktorom sa pracovalo s kultúrou *Lactobacillus rhamnosus*.

Zloženie MRS média:

Pepton	10 g
Mäsový extrakt	10 g
Kvasničný extrakt	5 g
Glukóza	20 g
Polysorbát 80	1 g
K ₂ HPO ₄	2 g
CH ₃ CO ₂ Na	5 g
Citrát amónium	2 g
MgSO ₄	0,1 g
MnSO ₄	0,05 g
Deionizovaná voda	1 000 ml

Baktérie boli napipetované do 50 ml centrifugačných skúmaviek, ktoré obsahovali pripravené MRS médium. Kultivácia takto pripravených kultúr prebehla vo vytemperovanom termostate na 37 °C. Baktérie boli odoberané po 36 hodinách a uchovávané pri teplote 4 °C.

4.3 Kultivácia probiotického kmeňa *Lactobacillus rhamnosus*

V tlakovom hrnci boli pri otvorení ventilu po dobu 60 minút vysterilizované 50 ml centrifugačné skúmavky obsahujúce MRS médium s koncentráciou 55,15 g/l. Tieto skúmavky, obsahujúce 40 ml MRS média, boli po ochladení na laboratórnu teplotu premiestnené do vysterilizovaného laminárneho boxu a bolo do každej skúmavky pridané 0,5 ml bakteriálnej kultúry *L. rhamnosus*. Baktérie boli kultivované vo vytemperovanom termostate pri teplote 37 °C po dobu 36 hodín.

4.4 Optimalizácia metódy prípravy biologického povrchu k stanoveniu bakteriálnej adhézie

Nasledujúce kapitoly popisujú optimalizačné kroky použité pri príprave modelového biologického povrchu a stanovení bakteriálnej adhézie.

4.4.1 Priprava roztokov

S ohľadom na použitý bakteriálny kmeň bolo k sledovaniu bakteriálnej adhézie zvolené prostredie simulujúce podmienky v ľudskom tele.

Priprava pufru Tris-HCl (50 mM, pH = 7,4)

Množstvo zlúčeniny tris(hydroxymethyl)aminomethan potrebné k príprave roztoku o koncentracii 6,059 g/l bolo navážené na predvážkach a kvantitatívne prevedené do odmernej banky o objeme 1 l. Odmerná banka bola doplnená na približne polovicu objemu deionizovanou vodou a pomocou

magnetickej miešačky bola navážka rozpustená. Tento roztok bol prídavku 3M HCl upravený na hodnotu $\text{pH} = 7,4$. Následne bol objem roztoku v odmernej banke po rysku doplnený deionizovanou vodou a premiešaný. Pripravený roztok Tris-HCl pufru bol uchovávaný v sklenenej zásobnej fľaši po dobu maximálne dvoch týždňov.

4.4.2 Príprava roztoku mucínu

Počas meraní bol použitý zásobný roztok mucínu o koncentráciách 1,5 mg/ml, 1,0 mg/ml a 0,7 mg/ml. Potrebné množstvo mucínu bolo navážené na analytických váhach a kvantitatívne prevedené do sklenenej reagenčnej fľaše. K navážkam bol pridaný príslušný objem Tris-HCl pufru spolu s magnetickou miešačkou. Uzavretá reagenčná fľaša bola umiestnená na magnetickú miešačku do vytemperovaného termoboxu na 37 °C a ponechaná v tomto stave cez noc.

4.4.3 Príprava mikročasticových sorbentov

Pre sorpčné experimenty boli vybrané rôzne druhy mikročasticových adsorbentov a pri realizácii pokusov boli využité rozličné množstvá sorbentov k overeniu sorpcie. Použité mikročasticové sorbenty Amberlite IRA-900, Amberlite XAD-4, Superlite DAX-8 a sklenené guľôčky boli navažované v množstvách 0,5 g, 0,3 g a 0,1 g, do prázdnych 10 ml centrifugačných skúmaviek. K navážkam bolo pridávaných 10 ml roztoku mucínu pripraveného podľa 4.4.2 alebo rozpúšťadla Tris-HCl, ktorého príprava prebiehala ako v kapitole 4.4.1. Takto pripravené vzorky boli umiestnené na trepačku a miešané po dobu 24 hodín pri laboratórnej teplote.

4.4.4 Optimalizácia metódy prípravy sorpčného povrchu

Na základe výsledkov meraní bol pre sorpciu bakteriálnej kultúry *L. rhamnosus* použitý mikročasticový adsorbent Amberlite IRA-900 v množstve 0,1 g. Pred samotnou sorpciou mucínu bol sorbent o hmotnosti 1 g premytý 12 krát v objeme 10 ml dH_2O .

4.4.5 Príprava vzoriek bakteriálnej kultúry

Bakteriálna kultúra pripravená podľa kapitoly 4.3 bola prevedená do 10 ml centrifugačných skúmaviek a odstredená po dobu 5 minút pri 5000 RPM. Po odstredení bol zo skúmaviek odliaty supernatant a bakteriálne bunky usadené na dne centrifugačnej skúmavky boli rozpustené v 7 ml dH_2O . Tento krok bol prevedený kvôli premytiu buniek od MRS média.

4.4.6 Úprava koncentrácie roztoku mucínu

Roztoky mucínu pripravené podľa postupu v bode 4.4.2 boli v kremenných kyvetách premerané na spektrofotometri HITACHI absorpčné spektrá od 200 nm do 800 nm oproti dH_2O a postupne riedené pufrom Tris-HCl.

4.4.7 Úprava koncentrácie bakteriálnych buniek

Zásobné roztoky bakteriálneho kmeňa *L. rhamnosus* pripravené postupom z kapitoly 4.4.5 boli postupným riedením dH_2O upravené na optickú hustotu (OD_{600}) 0,5; 0,3 a 0,1 pri vlnovej dĺžke 600 nm, ako blank slúžila dH_2O .

4.4.8 Štúdium adhézie buniek na mucín

Základom metódy experimentálneho štúdia adhézie bakteriálneho kmeňa na mikročasticové polymérne adsorbenty bolo najskôr potrebné nakultivovať mikroorganizmus viz kapitola 4.3. Následne bol pripravený roztok mucínu o koncentrácii 0,3 mg/ml v roztoku pufru Tris-HCl vid' kapitola 4.4.2. Sorpcia mucínu na mikročasticové polymérne adsorbenty bola prevedená vid' kapitola 4.4.3. Po 24 hodín trvajúcej sorpcii mucínu bol zvyšný roztok mucínu z centrifugačných skúmaviek odliaty. Pre sorpčný experiment adsorpcie baktérie bol vybraný mikročasticový polymérny adsorbent Amberlite IRA-900 pripravený vid' kapitola 4.4.4. Bakteriálna kultúra bola odoberaná po 36 hodinách kultivácie a vzorky boli ďalej pripravené podľa postupu v kapitole 4.4.5. OD_{600} bakteriálneho kmeňa *Lactobacillus rhamnosus* bola nastavená riedením na hodnoty 0,1, 0,3 a 0,5. Z takto pripravených bakteriálnych kultúr bolo odobraných 10 ml roztoku a pridaných k sorpčnému povrchu v plastových centrifugačných skúmavkách. Inkubácia vzoriek prebiehala vo vytemperovanom termoboxe pri teplote 37 °C za stáleho

miešania na trepačke po dobu jednej hodiny. Príslušné množstvo takto pripravených vzoriek bolo odpipetované do kremennej kyvety a zmeraná jeho absorbanca na UV-VIS spektrofotometri pri vlnovej dĺžke 200 až 800 nm oproti dH₂O ako blanku.

Samotné roztoky mucínu a bakteriálneho kmeňa s príslušnou OD boli používané na porovnanie. Príprava týchto roztokov prebiehala paralelne so samotnými vzorkami a prebiehala rovnakým postupom za rovnakých podmienok.

4.4.9 Príprava vzoriek pre infračervenú spektroskopiu a SEM

Po zmeraní vzoriek na UV-VIS spektrofotometri bol z centrifugačných odliaty supernatant a sorbenty boli premiestnené na označené Petriho misky. Petriho misky boli ponechané v termoboxe vytemperovanom na 43 °C cez noc. Tieto vzorky boli po vybratí z termoboxu a vychladnutí na laboratórnu teplotu zmerané pomocou infračervenej spektroskopie a skenovacej elektrónovej mikroskopie. Priebeh týchto metód je popísaný v kapitolách 4.5 a 4.6.

4.5 Charakterizácia povrchu adsorbentov pomocou infračervenej spektroskopie

Analýza pripravených vzoriek vid' kapitola 4.4.9 bola prevedená na spektrofotometri FTIR Nicolet iS50 s jednorazovým diamantovým ATR nástavcom. Po zmeraní pozadia (vzduch) bolo na diamantový kryštál ATR nástavca nanesené potrebné množstvo vysušenej vzorky sorbentu. V závislosti na vlnóčte v spektrálnom rozsahu od 4000 do 400 cm⁻¹ bola meraná absorbanca a získané spektrum bolo stanovené ako priemer 32 meraní. Na meranie boli pripravené vzorky sorbentu Amberlite IRA-900 vid' kapitola 4.4.9 Tento sorbent obsahoval naadsorbovaný mucín a *L.rhamnosus*. Zmerané boli aj kontrolné vzorky s naadsorbovaným samotným mucínom a bakteriálnym kmeňom, ktoré boli pred inkubáciou s bakteriálnym kmeňom uchované v pufry Tris-HCl.

4.6 Skenovacia elektrónová mikroskopia

Vzorky, ktoré boli použité aj v prípade FTIR spektroskopického zobrazenia boli použité aj k analýze skenovacou elektrónovou mikroskopiou (SEM). Príprava týchto vzoriek je uvedená v kapitole 4.4.9. Samotná analýza vzoriek bola prevedená pomocou skenovacieho elektrónového mikroskopu ZEISS EVO-LS 10. Zobrazenie prebehlo v móde SE1 a prevedenie snímok bolo zhotovené v móde s urýchľovacím napätím 10 kV. Detaily zobrazenia výsledkov pomocou danej metódy sú uvedené na snímkach v kapitole 5.1.5.

4.7 Charakterizácia vzoriek pomocou mikrokolorimetrie

Pred samotnou analýzou pomocou mikrokolorimetrie boli vzorky sorbentu Amberlite IRA-900 pripravené podľa postupu v kapitole 4.4.3 a bakteriálny kmeň postupom, ktorý popisuje kapitola 4.4.5. Následne bol sorbent premytý v dH₂O a bakteriálny kmeň *Lactobacillus rhamnosus* upravený na OD₆₀₀ 0,5 postupným riedením dH₂O ako popisuje kapitola 4.4.7. Takto pripravený sorbent bol spolu s 3 ml bakteriálnej kultúry odpipetovaný do 4 ml ampúl. Ampule so vzorkami boli následne uzavreté a meranie prebiehalo po dobu 94 hodín pri teplote 25 °C na Modulárnom mikrokolorimetri TAM III.

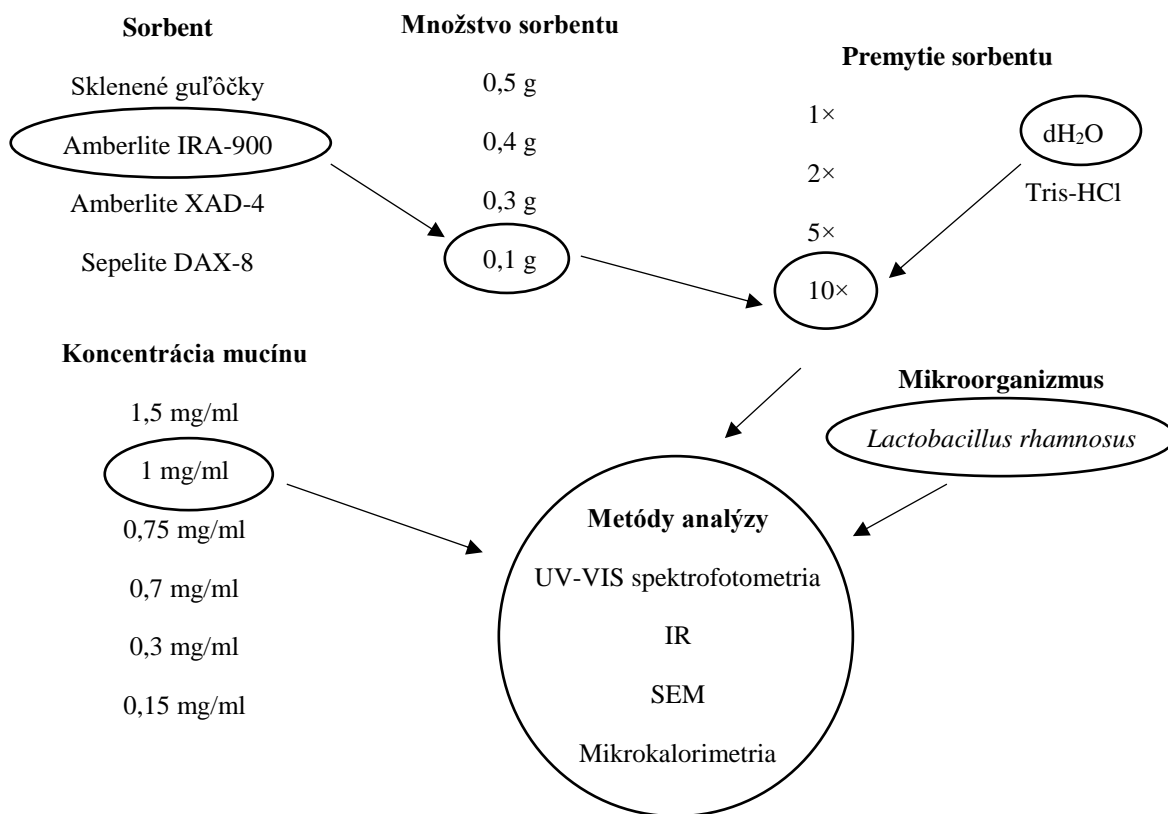
5 Výsledky a diskusia

5.1 Návrh a optimalizácia postupu štúdia adsorpcie

Pre optimalizáciu jednotlivých krokov a realizáciu experimentálnej časti práce boli použité poznatky z teoretickej časti bakalárskej práce.

Základným predpokladom adhézných experimentov bola skutočnosť, že bakteriálny kmeň *Lactobacillus rhamnosus* adheruje na hlavnú zložku hlienu gastrointestinálneho traktu, a to na mucín. Kľúčovým krokom bolo nanosenie vrstvy mucínu na mikročasticové polymérne adsorbenty a následná adhérenca bakteriálneho kmeňa. Ovrstvenie adsorbentov mucínom bolo dosiahnuté pomocou už popísaného postupu vyššie (viď kapitola 4.4.3), potom boli na takto vzniknutom kombinovanom sorpčnom povrchu naviazané bakteriálne bunky (viď kapitola 4.4.8). Po adhézii bakteriálnych buniek na sorpčný povrch bolo spektrofotometricky zmerané množstvo bakteriálnej kultúry v supetnanatne, z ktorého bol vypočítaný úbytok baktérii v bakteriálnej suspenzii. Toto množstvo reprezentovalo bunky bakteriálnej kultúry, ktoré sa nenaviazali na pripravený sorpčný povrch. Pri každom meraní boli zaradené aj kontrolné vzorky sorbentu bez bakteriálnych buniek, ktoré slúžili k charakterizácii adhérence buniek na neovrstvený povrch porézneho mikroparticulárneho sorbentu. Inými slovami kontrolné vzorky slúžili k zisteniu špecifických zmien sorpčného procesu, ktoré sú spojené s prítomnosťou mucínu a charakterizujú tak špecifickú interakciu medzi bunkami mikroorganizmu a vrstvou molekulárneho adheziva (mucínu).

Ako je vidieť na obrázku 8, v prípade návrhu a prípravy modelového sorpčného povrchu pre štúdium adhézie vybraného probiotického kmeňa je nutné optimalizovať nielen druh nosného sorbentu, ale aj spôsob úpravy jeho povrchu, tj. jeho ovrstvenie mucínom. Z tohto pohľadu bolo kľúčové vybrať vhodnú koncentráciu mucínu aby vznikla na povrchu sorbentu dostatočná vrstva tejto látky slúžiaca k prichyteniu baktérii. V priebehu experimentu boli použité viaceré metódy analýzy, ktoré slúžili k overeniu jednotlivých prevedených krokov i samotnému sledovaniu adsorpcie bakteriálnych buniek k sorpčnému povrchu. Bližšie je priebeh experimentov popísaný v nasledujúcich kapitolách.



Obrázok 8: Optimalizačné schéma experimentálneho postupu štúdia adhézie bakteriálneho kmeňa na mucín

5.1.1 Výber sorbentu

Pre výber vhodného sorbentu voči mucínu boli pôvodne zvolené štyri typy sorbentu. Postupne boli testované sklenené guľôčky a mikročasticové polymérne adsorbenty, konkrétne Amberlite IRA-900 (IRA), Amberlite XAD-4 a Supelite DAX-8, ktoré sú bližšie charakterizované v tabuľke 3. Už pri prvých pokusoch sa objavili značné rozdiely v sorpcii mucínu na jednotlivé sorbenty, ktorá sa charakterizovala prostredníctvom monitorovania optickej hustoty roztoku mucínu v priebehu sorpčného experimentu (odpovedá pri meraní pomocou UV-VIS spektrometrie absorbancii) pri charakteristickej vlnovej dĺžke mucínu (260 nm). Porovnanie výsledkov z experimentálneho využitia jednotlivých sorbentov sa nachádza v tabuľke 4. Z výsledkov jednoznačne vyplýva ako najvhodnejší sorbent pre ďalšie experimenty Amberlite IRA-900, ktorý ako jediný sorbent vykazoval zníženie obsahu mucínu v supernatante po 24 hodín trvajúcej sorpcii.

Tabuľka 3: Vybrané mikročasticové polymérne adsorbenty a ich vlastnosti

Adsorbent	Veľkosť častíc	Charakteristika	Vlastnosť
Amberlite IRA-900	650-820 μm	Styrén-divinylbenzén, povrchovo modifikovaný skupinami $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$ (makroretikulárny)	hydrofilný
Amberlite XAD-4	20-60 mesh	Styrén-divinylbenzén, (makroretikulárny)	hydrofóbny
Supelite DAX-8	40-60 mesh	Ester polyakrylovej kyseliny (mikroretikulárny)	hydrofóbny

Tabuľka 4: Porovnanie sorpcie mucínu na jednotlivé sorbenty

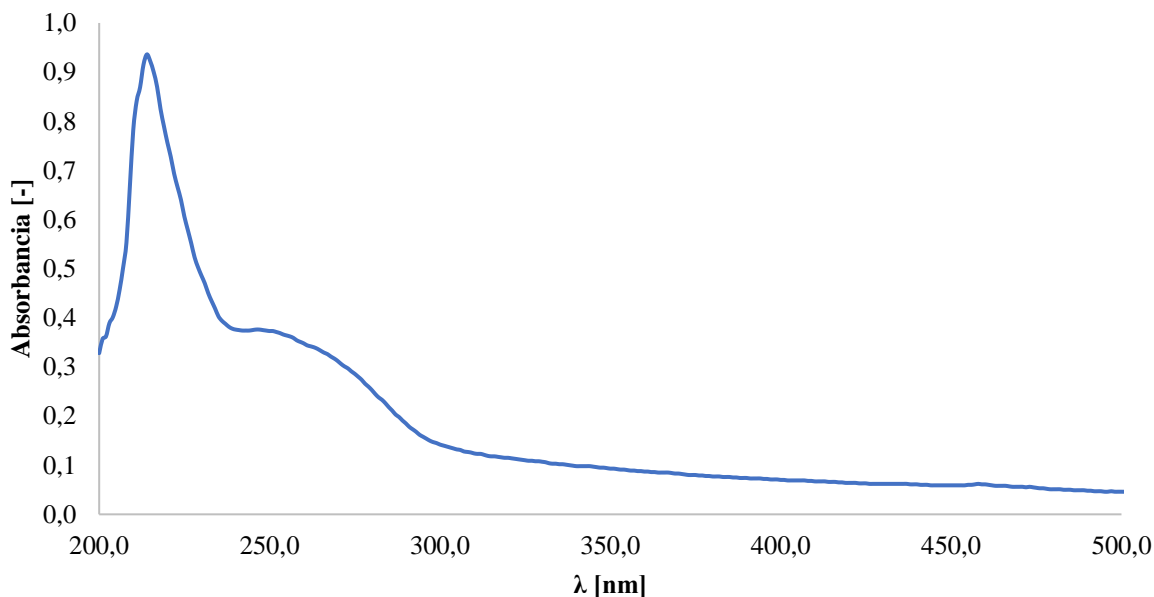
Adsorbent	OD ₂₆₀ pred	OD ₂₆₀ po	Rozdiel OD ₂₆₀ pred a po
Amberlite IRA-900	0,449	0,368	-22,12 %
AMberlite XAD-4	0,449	0,526	+15,58 %
Supelite DAX-8	0,449	0,561	+20,01 %
Sklenené guľôčky	0,152	0,254	+40,08 %

Rozdiel medzi sorpciou mucínu na sorbent IRA a zvyšné sorbenty použité v experimente, zobrazený v tabuľke 4, môže byť spôsobený jeho odlišnou povrchovou štruktúrou. Na povrchu tohto sorbentu sa totiž nachádza skupina $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$, ktorá zapríčiňuje jeho vlastnosti ako napríklad hydrofilnosť. Ako jediný sorbent preukázal naviazanie mucínu už pri prvotných meraniach a preto je používaný pri ďalších experimentoch. U ostatných sorbentov dochádzalo k zakaleniu roztoku, zrejme v dôsledku uvoľňovania polymérnych komponent z mikročastíc. Táto skutočnosť by komplikovala aj sorpčný ďalší priebeh experimentu, táto skutočnosť tiež prispela k vybraniu sorbentu IRA k ďalšej práci.

5.1.2 Optimalizácia adsorpčnej koncentrácie mucínu voči sorbentu

V rámci postupu prípravy sorbentu probiotických buniek bolo ďalej dôležité optimalizovať množstvo mucínu, ktoré sa naviaže na povrch sorbentu. V rámci tohto experimentu boli zmerané vzorky s viacerými koncentraciami mucínu pripravených podľa postupu, ktorý popisuje kapitola 4.4.6. Príklad získaného adsorpčného spektra roztoku mucínu sa nachádza na nasledujúcom grafe 1. Počas optimalizácie metódy boli použité rôzne koncentrácie mucínu a to 1,5 mg/ml, 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,7 mg/ml a ďalej koncentrácie využité pre zistenie kalibračnej závislosti absorbancie mucínu na jeho koncentracii v roztoku. Súčasne boli pri tejto časti optimalizácie metódy prípravy sorpčného povrchu používané rôzne množstvá sorbentu. Použité navážky boli o hmotnosti 0,1, 0,3, 0,4 a 0,5 g na 10 ml roztoku mucínu o vybranej koncentrácii.

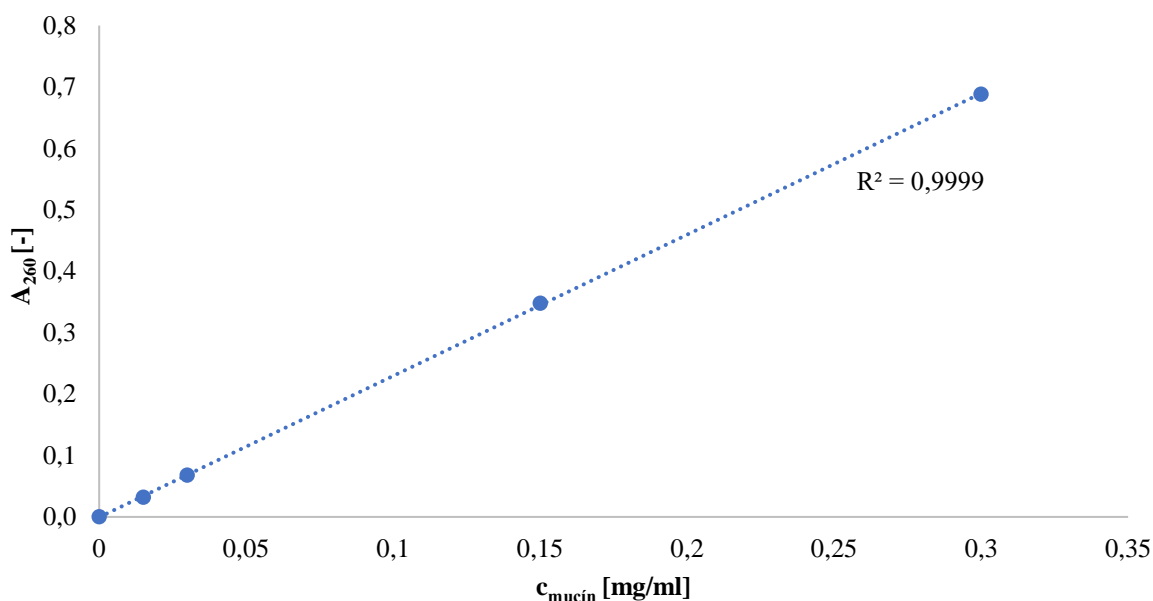
Mucín použitý v tejto práci je glykoproteín zložený z 20 % proteínu a zvyšné množstvo je tvorené predovšetkým polysacharidmi o čom pojednáva kapitola 2.2.1.1. V prípade proteínov absorbujú v UV oblasti aromatické aminokyseliny a vykazujú dve absorpčné maximá, ktoré sú vidieť na grafe 1. Prvé maximum proteínov sa vyskytuje v rozmedzí 200-230 nm a druhé pri cca 260 nm. Vzhľadom k tomu, že mucín nie je zložený výhradne z proteínov ale jedná sa o glykoproteín, môžu byť maximá mierne posunuté. Tento posun je spôsobený vplyvom ostatných skupín v jeho reťazci.



Graf 1: Absorpčné spektrum mucínu v pufrí Tris-HCl (pH 7,4)

Ako už bolo naznačené vyššie, absorpčné spektrá mucínu boli premerané pre viacero koncentrácií. Experimentálne tak bola potvrdená lineárna závislosť absorbancie mucínu na jeho koncentrácii. Vzorky slúžiace pre zostrojenie kalibračnej krivky boli pripravené o známych koncentráciách mucínu, ktorý bol rozpustený v pufrí Tris-HCl. Rozpúšťaním mucínu v pufrí Tris-HCl pri teplote 37 °C a následným riedením boli pripravené roztoky mucínu s koncentraciami 0,01, 0,03, 0,15 a 0,3 mg/ml vybrané pre vytvorenie kalibračnej závislosti. Postup prípravy týchto vzoriek popisuje kapitola 4.4.6. Na základe korelačného koeficientu môžeme usudzovať, že hodnota absorbancie pri 260 nm môže byť použitá pre stanovenie obsahu mucínu vo vzorkách. Táto závislosť spolu s korelačným faktorom je zobrazená na grafe 2. Vzhľadom k tomuto zisteniu, bola v nasledujúcich experimentoch hodnota absorbancie (vyjadrovaná podľa zvyklostí v obore mikrobiológie ako optická hustota) roztoku pri vlnovej dĺžke 260 nm využívaná k porovnaniu obsahu mucínu vo vzorkách.

V priebehu optimalizácie metódy prípravy vhodného sorpčného povrchu sme dospeli k problému, kedy sorbent uvoľňoval látky do roztoku, v ktorom sa nachádzal (obdobne ako ostatné mikroparticulárne sorbenty – viz tab. 4). Tento problém sa podarilo odstrániť premývaním samotného sorbentu ešte pred samotným experimentom s naviazaním mucínu. Po 12 násobnom premytí sorbentu boli všetky látky, ktoré mohol sorbent uvoľňovať odstránené práve spomenutým premývaním. Ako premývací roztok bola zvolená dH₂O a pufr Tris-HCl. Keďže výsledky premývania nezáviseli od použitého premývadla, bola na premývanie pre ďalšie experimenty zvolená desionizovaná voda. Na základe experimentov, realizovaných v tejto časti práce, bola ako optimálna kombinácia pre nasledujúce experimenty zvolená

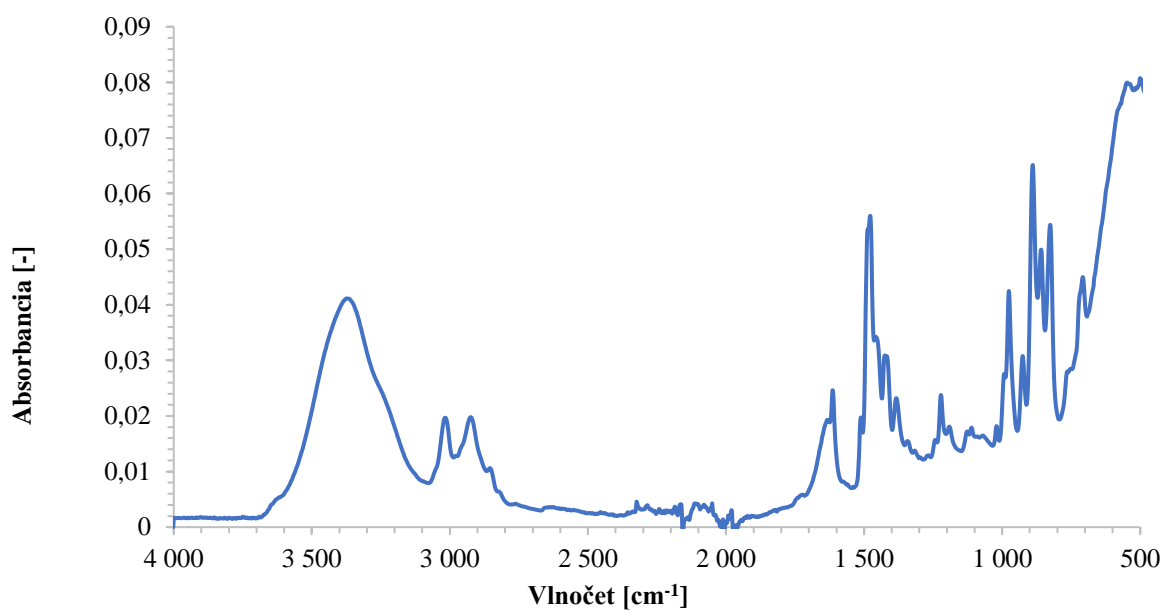


Graf 2: Kalibračná závislosť absorbancie mucínu pri 260 nm na jeho koncentrácii

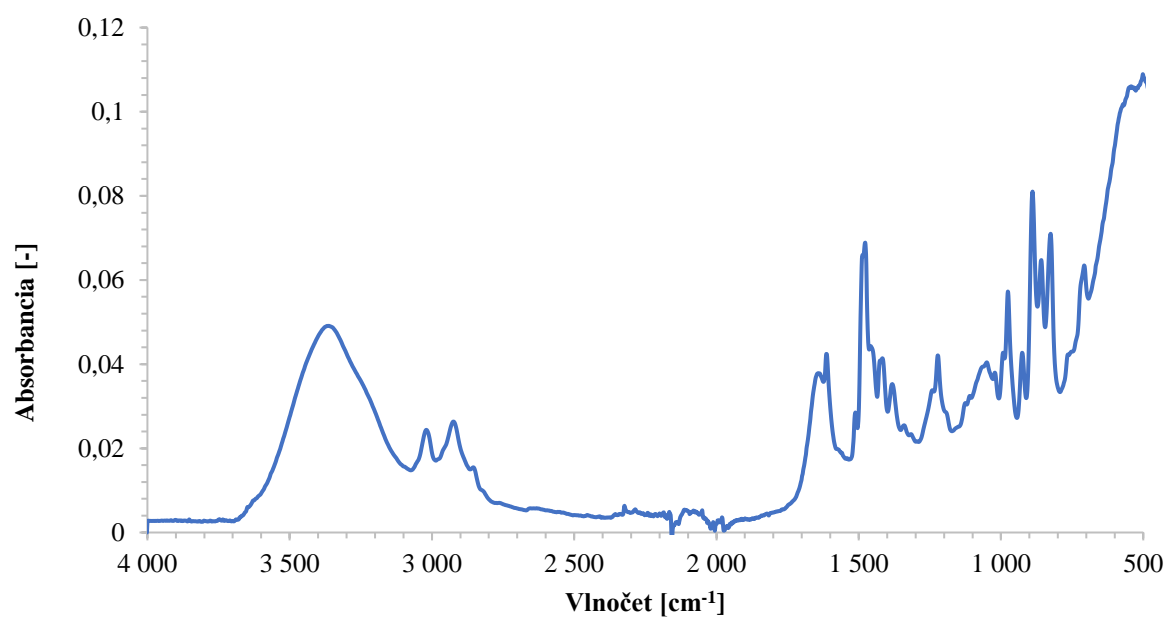
množstvo 0,1 g sorbentu premytého vo vode, ovrstvovaného následne v 10 ml roztoku mucínu o koncentrácií 1 mg/ml v Tris-HCl pufru.

5.1.3 Analýza štruktúry sorbentu pred adsorpciou buniek

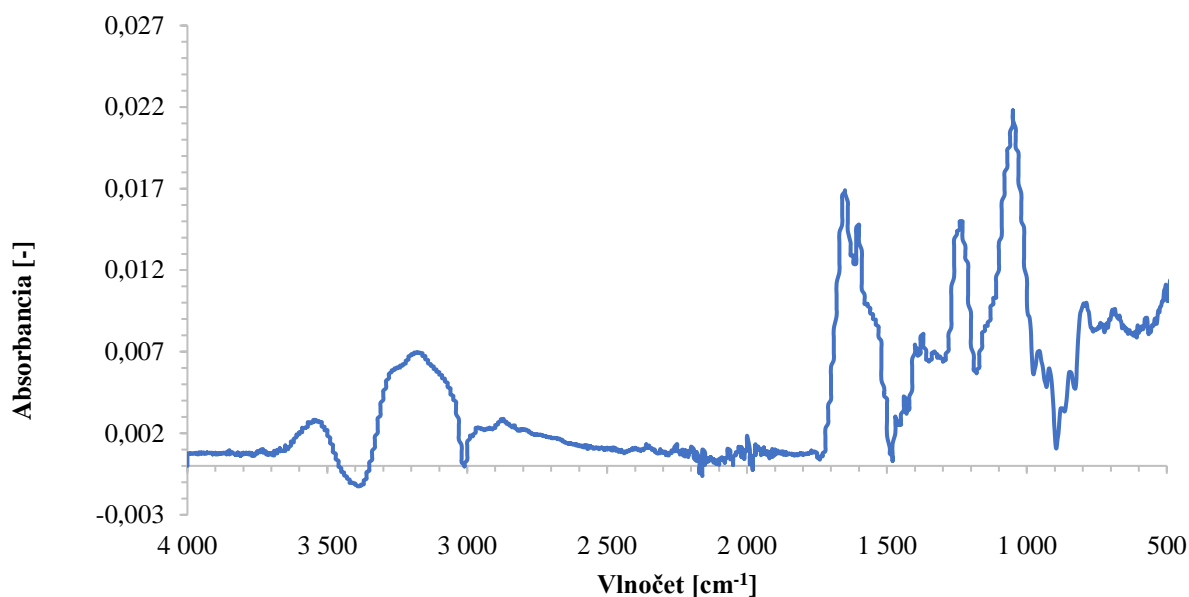
K charakterizácii pripraveného sorpčného povrchu bola využitá infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou (FTIR). Podmienky experimentu merania pomocou FTIR popisuje kapitola 4.5. K vyhodnoteniu výsledkov boli použité infračervené spektrá so zobrazenou absorbanciou v rozmedzí vlnočty $4\,000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Na nasledujúcom grafe 3 vidíme spektrum povrchu adsorbentu Amberlite IRA-900, ktorý ako už bolo zmienené v kapitole 5.1.1 je na povrchu pokrytý modifikovanými skupinami $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$. Tento sorbent bol pred samotným experimentom premytý deionizovanou vodou ako popisuje kapitola 4.4.4. V spektre je výrazne viditeľný absorpčný pás pri vlnočte $1\,640\text{ cm}^{-1}$ spôsobený vibráciou väzby N-H v spojení s valenčnou vibráciou väzby C-N ($1\,560\text{--}1\,530\text{ cm}^{-1}$). Rovnako je na spektre prítomná esterová skupina C=O v oblasti v rozmedzí $1\,750\text{ až }1\,730\text{ cm}^{-1}$, ktorá je pre danú skupinu charakteristická. Zatiaľčo absorpčný pás v rozmedzí $3\,100\text{--}3\,000\text{ cm}^{-1}$ je typický pre vibráciu skupiny C-H v aromatických zlúčeninách. Absorpčný pás viditeľný v oblasti $3\,300\text{--}3\,700\text{ cm}^{-1}$ môže vznikáť v dôsledku vlhkosti adsorbentu. Na grafe 4 je zobrazený povrch sorbentu s naviazaným mucínom. Postup prípravy tohto vzorku popisuje kapitola 4.4.3. Na tomto grafe vidíme okrem spektra povrchu adsorbentu aj spektrá typické pre mucín. Mucín je tvorený základným reťazcom proteínu s naviazanými polysacharidmi, viac o štruktúre mucínu pojednáva kapitola 2.2.1.1. Pre proteíny, ktoré sa skladajú z aminokyselín pospájaných prostredníctvom peptidových väzieb a základnou jednotkou sú substitučné deriváty karboxylových kyselín (čiže aminokyseliny), je typický absorpčný pás v oblasti $3\,500\text{--}3\,000\text{ cm}^{-1}$. Pre polysacharidy leží typické absorpčné spektrum v rozmedzí $1\,695\text{--}1\,750\text{ cm}^{-1}$. Posledné dve spomenuté oblasti môžeme nájsť v grafe 4. Pre jednoduchšie porovnanie povrchu čistého sorbentu a sorbentu s naviazaným mucínom bol zostrojený graf 5, ktorý zobrazuje rozdiel medzi jednotlivými povrchmi. Na tomto grafe môžeme potvrdiť prítomnosť proteínu ako aj polysacharidov dokazujúcich prítomnosť vrstvy mucínu na sorpčnom povrchu.



Graf 3: Povrchová štruktúra čistého sorbentu IRA premytého v dH₂O stanovená pomocou ATR-FTIR spektroskopie



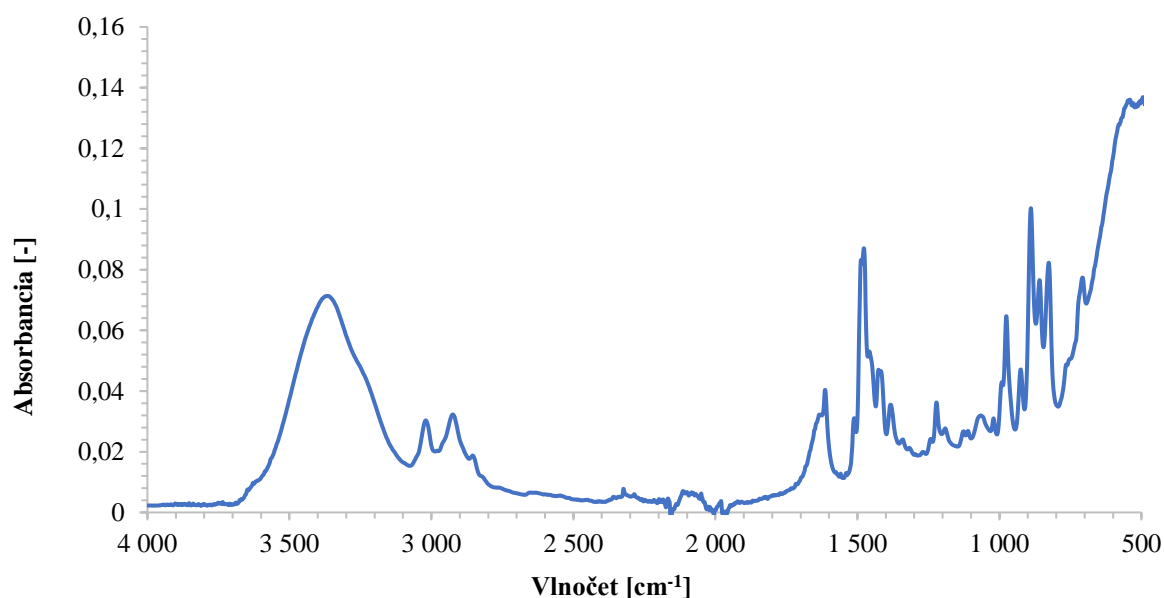
Graf 4: Povrchová štruktúra sorbentu IRA premytého v dH₂O s naviazaným mucínom stanovená pomocou ATR-FTIR spektroskopie



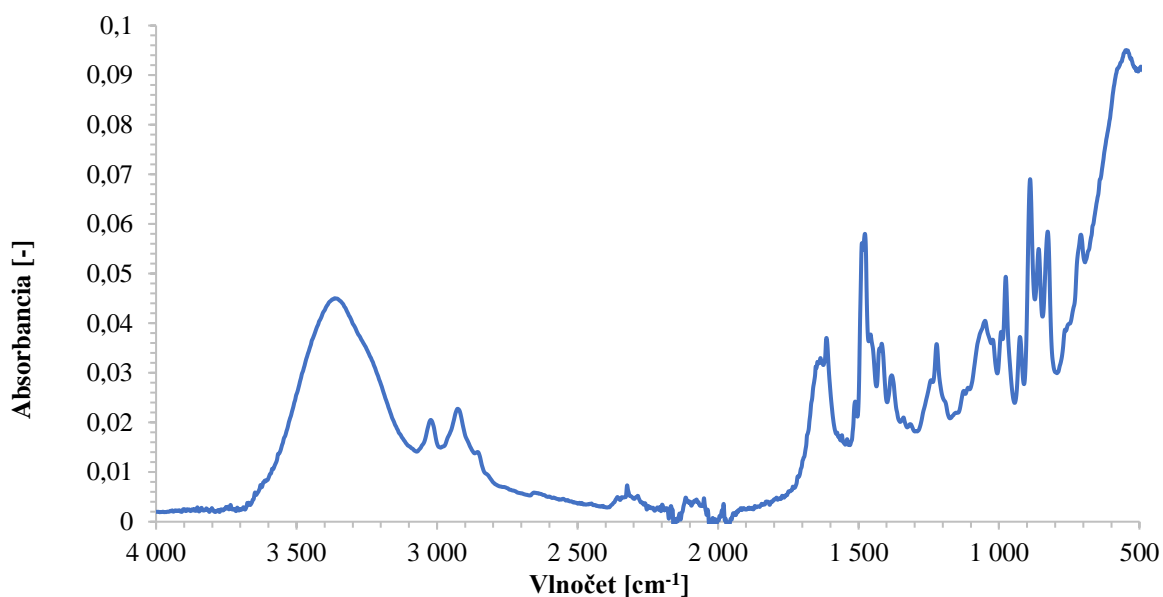
Graf 5: Spektrum vzniknuté odčítaním grafov 3 a 4

Po experimentálnom dokázaní prítomnosti vrstvy mucínu na adsorbente nasledoval experiment, ktorého cieľom bolo zistiť či pri premytí sorbentu pomocou pufru Tris-HCl nastane zmena v interakcií medzi sorbentom a mucínom, napr. v dôsledku zmeny povrchového náboja sorbentu. Práve k tomuto účelu slúžilo premývanie čistého sorbentu pufrom Tris-HCl. Premývanie prebehlo rovnakým postupom, ktorý popisuje kapitola 4.4.4 ale premývacím roztokom bol tentokrát pufr Tris-HCl.

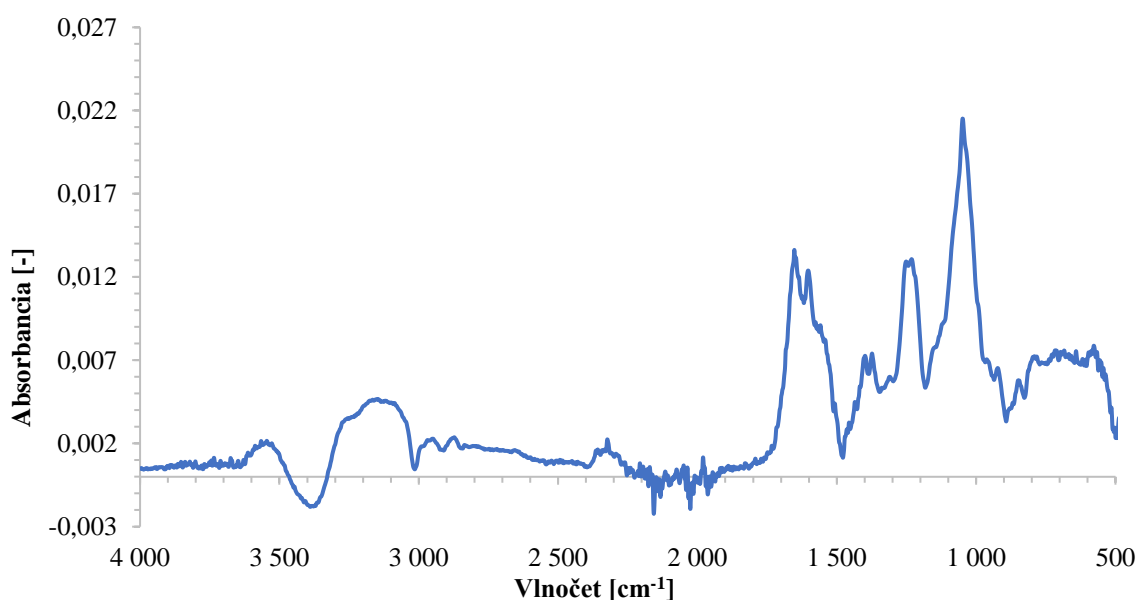
Po príprave nových vzoriek, bola opäť prevedená analýza pomocou FTIR. Absorpčné spektrá sorpčného povrchu, kedy bol adsorbent Amberlite IRA-900 premytý v pufru Tris-HCl, sa nachádzajú v grafoch 6, 7 a 8. Opäť môžeme vidieť charakteristické absorpčné pásy jednotlivých skupín popísaných vyššie. Pri porovnaní výsledných spektier pri použití dH_2O alebo pufru Tris-HCl ako premývacích roztokov, môžeme usudzovať, že výsledné absorpčné spektrum sa mení zanedbateľne, preto sme pri ďalších experimentoch premývali sorbent len v deionizovanej vode.



Graf 6: Povrchová štruktúra čistého sorbentu premytého v pufru Tris-HCl



Graf 7: Povrchová štruktúra sorbentu premytého pufrom Tris-HCl s naviazaným mucínom



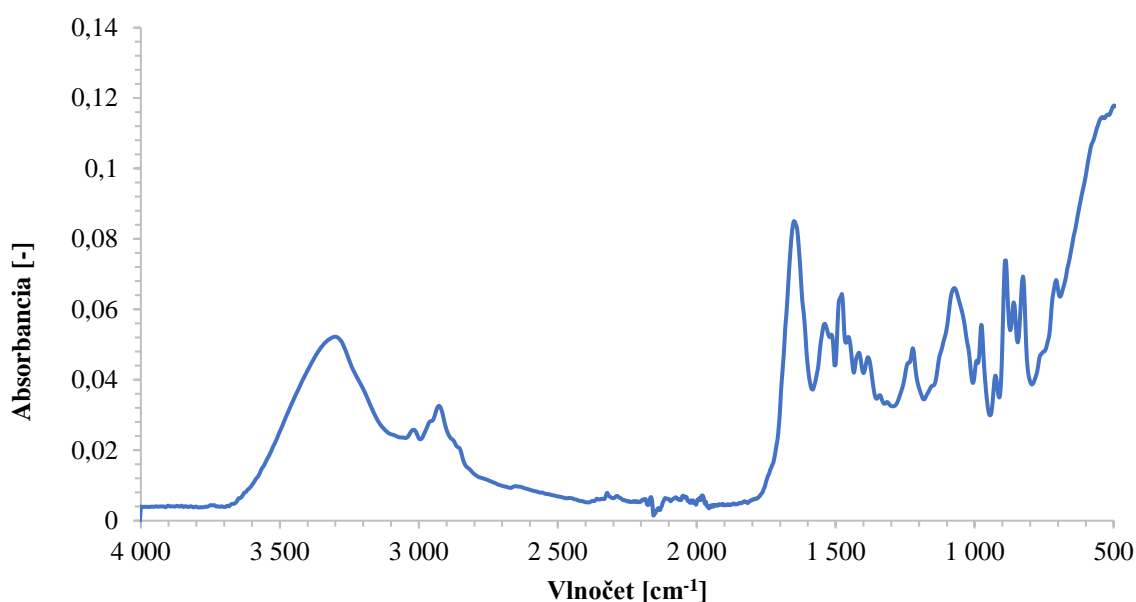
Graf 8: Povrchová štruktúra vzniknutá odčítaním grafov 6 a 7

5.1.4 Analýza štruktúry sorbentu po adsorpcii buniek

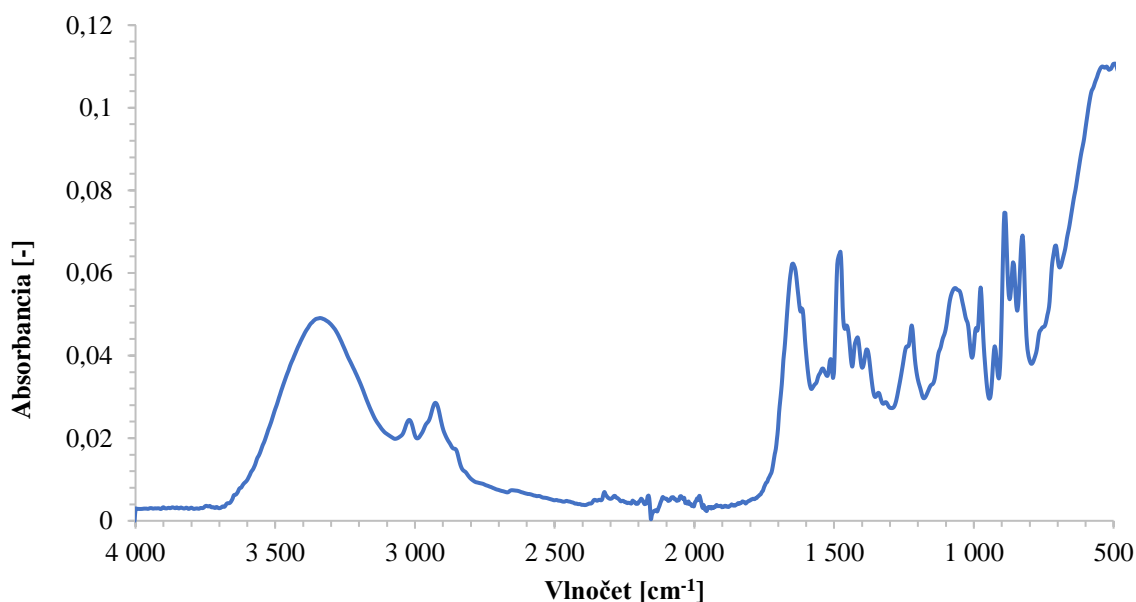
Po adsorpcii mikrobiálnych buniek *Lactobacillus rhamnosus* na vrstvu mucínu naviazaného na sorbent IRA i na čistý porch sorbentu boli povrchové zmeny charakterizované opäť pomocou infračervenej spektroskopie s Fourierovou transformáciou (FTIR). Experimentálne podmienky merania pomocou IČ popisuje kapitola 4.5. K vyhodnoteniu boli použité infračervené spektrá so zobrazenou absorbanciou v rozmedzí vlnočtu 4 000–400 cm^{-1} .

Po ukončení sorpčných experimentov bakteriálneho kmeňa *L. rhamnosus* s adsorbentom Amberlite IRA-900 boli jednotlivé vzorky vložené na Petriho misky a umiestnené do termoboxu vytemperovaného na 43 °C. Po usušení a vychladnutí boli tieto vzorky analyzované pomocou infračervenej spektroskopie. Postup prípravy vzoriek pre IR je popísaný v kapitole 4.4.9.

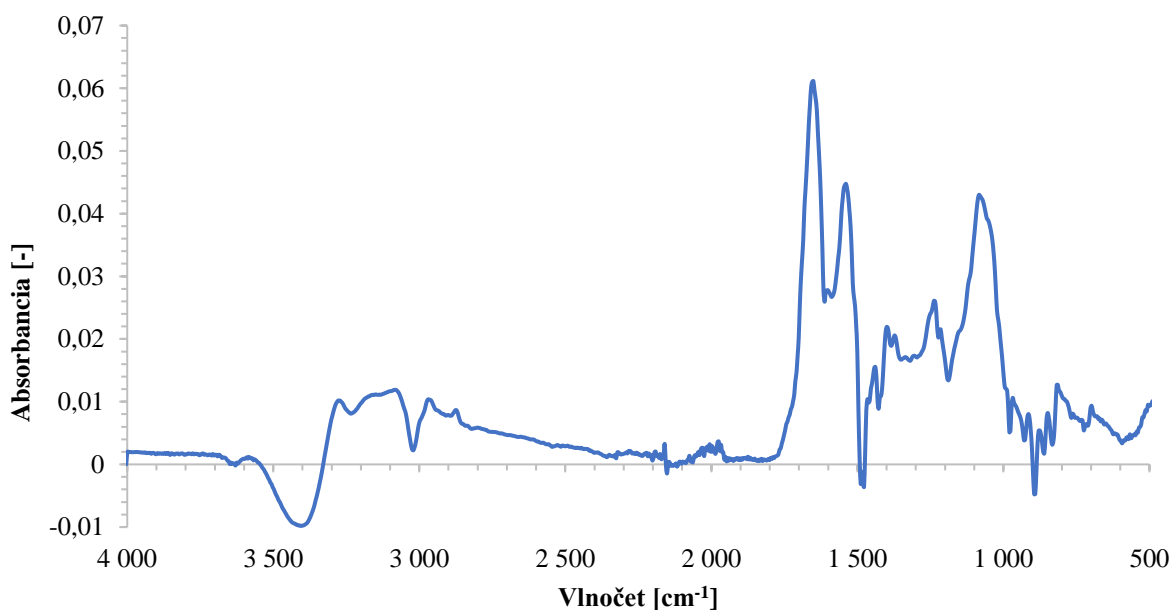
Okrem spomínaných absorpčných pásom môžeme po sorpcii baktérie *L. rhamnosus* pozorovať objavenie ďalších absorpčných oblastí pri vlnotoch 1 660 a 1 550 cm^{-1} . Tieto pásy poukazujú na prítomnosť amidov na povrchu sorbentu, absorpčný pás pri vlnote 1 660 cm^{-1} je spojený s valenčnými vibráciami karbonylových skupín pozdĺž polypeptidového reťazca a pás pri vlnote 1 550 cm^{-1} je spôsobený valenčnou vibráciou väzby N-H v spojení s valenčnou vibráciou C-N väzby. Práve na základe týchto špecifických píkovo bolo možné pozorovať adhéziu bakteriálnych buniek *L. rhamnosus* na sorbent s naadsorbovaným mucínom či sorbent bez mucínu.



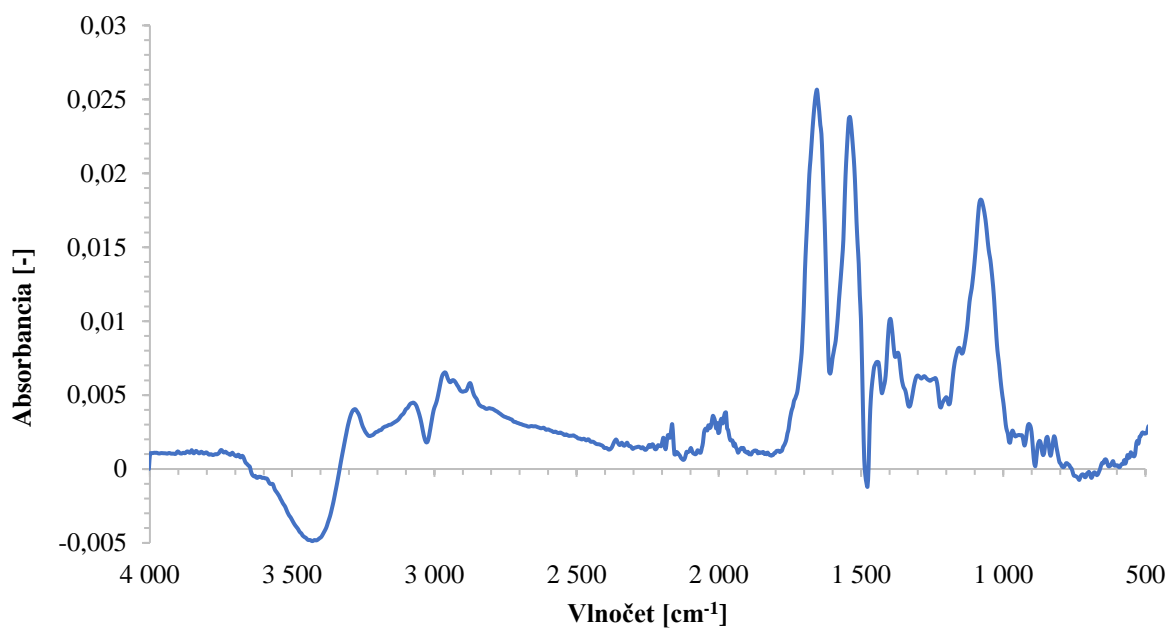
Graf 9: Povrchová štruktúra samotného sorbentu IRA po adhézii *L. rhamnosus*



Graf 10: Povrchová štruktúra sorbentu IRA s mucínom po sorpcii *L. rhamnosus*



Graf 11: Rozdiel povrchovej štruktúry sorbentu bez mucínu pred (graf 3) a po sorpcii baktérie *L. rhamnosus* (graf 9)



Graf 12: Rozdiel povrchovej štruktúry sorbentu s mucínom pred (graf 4) a po (graf 10) adsorpcii baktérie *L.rhamnosus*

Prostredníctvom merania pomocou infračervenej spektroskopie bola sledovaná absorbancia vzoriek na vlnočte. Najlepšie viditeľné rozdiely medzi jednotlivými charakteristikami skúmaného povrchu sú viditeľné na grafoch, ktoré vznikli odčítaním základného povrchu a tohto povrchu po sorpcii, ide o grafy 5, 8, 11 a 12. Východzí graf pre všetky merania bol graf 3, ktorý zobrazuje povrchovú štruktúru čistého sorčného povrchu sorbentu IRA premytého v dH₂O. Na tomto grafe sa nachádza pík typický pre sorbent IRA, ktorý je charakteristický pre skupinu N⁺(CH₃)₃Cl⁻. Z grafu 5 môžeme usudzovať, že sa na povrchu sorpčného povrchu nachádzajú skupiny proteínov a polysacharidov, ktoré sa vyskytujú v štruktúre mucínu. Porovnaním grafov 5 a 8, môžeme usudzovať, že zloženie nami použitých premývacích

roztokov (dH_2O a Tris-HCl) nemá vplyv na naviazanie mucínu na povrch sorbentu. Ďalšími experimentami sa nám podarila dokázať prítomnosť *Lactobacillus rhamnosus* na sorpčnom povrchu. *L. rhamnosus* sa vyskytoval ako na povrchu čistého sorbentu, čo zobrazuje graf 11, tak i na povrchu sorbentu s naviazaným mucínom. Zmena povrchovej štruktúry sorbentu s naviazaným mucínom s baktériami *L. rhamnosus* je ilustrovaná na grafe 12. Prítomnosť bakteriálneho kmeňa v povrchovej štruktúre vzoriek dokazuje pík charakteristický pre amidy. Všetky merania boli prevedené vo viacerých opakovaniach a vždy boli zároveň k meraniu zaradené i kontrolné vzorky.

Pomocou infračervenej spektroskopie s Fourierovou transformáciou sa nám podarilo dokázať prítomnosť baktérií avšak touto metódou nie je možná vizualizácia povrchovej štruktúry daných povrchov. K zobrazeniu povrchovej štruktúry vybraného sorpčného povrchu bola použitá metóda skenovacej elektrónovej mikroskopie (SEM), o ktorej pojednáva nasledujúca kapitola.

5.1.5 Vizualizácia sorbentu v jednotlivých krokoch experimentu

K vizualizácii povrchu sorbentov, ako už bolo zmienené, bola využitá metóda SEM. Na obrázkoch 9 a 10 môžeme vidieť porovnanie snímok pripravovaných vzoriek. Pri porovnaní snímok môžeme vidieť zmeny v počte naviazaných buniek na sorbent IRA. Tieto rozdiely sú spôsobené prítomnosťou vrstvy mucínu na adsorbente.

Konkrétne obrázok 9 zobrazuje zmeny povrchovej štruktúry, ktorým makroporézny adsorbent Amberlite IRA-900 podlieha v dôsledku ovrstvenia mucínom. (podľa postupu vid' kapitola 4.4.3). V prvej rade na obrázkoch 10-1a a 10-1b je zobrazený povrch adsorbentu bez akýchkoľvek úprav pri rôznom zväčšení (1000 a 1000 \times). Môžeme na ňom vidieť, že samotný povrch čistého sorbentu nie je dokonale hladký a sú na ňom vidieť určité deformácie, ktoré môžu reprezentovať prirodzenú porozitu a povrchovú drsnosť mikroporézneho sorbentu, ale mohli tiež vzniknúť pri manipulácii so sorbentom (čo by mohlo súvisieť so vznikom zákalu pri promývaní sorbentu), ako aj pri jeho sušení. Obrázky 10-2a a 10-2b vznikli po premytí sorbentu deionizovanou vodou. Po premytí sorbentu vidíme na jeho povrchu zmeny oproti pôvodnému povrchu mucínu, ktoré mohli vzniknúť mechanickým poškodením. Sorbent s naadsorbovaným mucínom je zobrazený na obrázkoch 10-3a a 10-3b, kde môžeme jasne vidieť zmeny povrchu sorbentu. Na týchto obrázkoch si môžeme všimnúť rôzne útvary nachádzajúce sa na povrchu sorbentu. Medzi týmito útvarmi sa zaiste nachádza mucín ale i tvary pripomínajúce kryštáliky, ktoré sa mohli na sorbent dostať z pufru Tris-HCl, či iné útvary, ktoré môžu byť zapríčinené organickým znečistením z mucínu. Tento povrch je zobrazený aj na obrázkoch 4a a 4b.

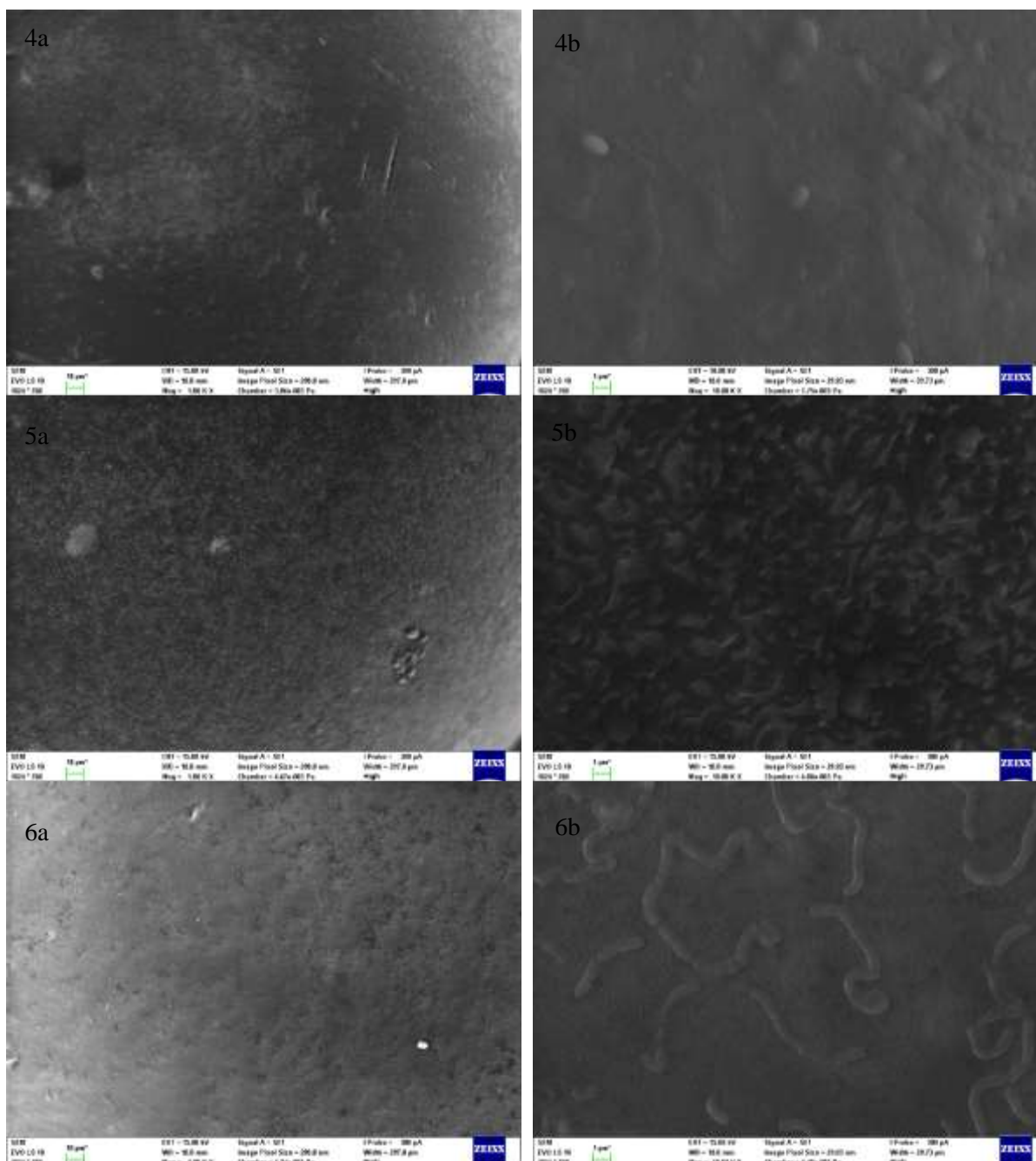
Výsledky sorpčného experimentu s použitím *L. rhamnosus* sú zobrazené na obrázku 10, pričom na 4a a 4b je zobrazený sorpčný povrch adsorbentu Amberlite IRA-900 s mucínom pre porovnanie. *L. rhamnosus*, ktorý sa ponechal sorbovať na premytý sorbent bez prítomnosti mucínu je zobrazený na obrázkoch 5a a 5b. Na týchto obrázkoch je vidieť hojné zastúpenie bakteriálnych buniek na povrchu neovrstveného sorbentu. Avšak i tieto obrázky zobrazujú určité znečistenie povrchu, ktoré mohlo nastať v priebehu sušenia vzoriek a nesterilným prostredím termoboxu. Bakteriálne bunky sa nachádzajú i na povrchu sorbentu pokrytého mucínom. Táto adsorpcia je zobrazená na obrázkoch 6a a 6b.

Z porovnania jednotlivých postupných výsledkov môžeme vidieť rozdiely v efektivite sorpcie bakteriálnych buniek na rôzne povrchy. Z obrázku 10 môžeme usudzovať, že *L. rhamnosus* sa sorbuje na povrch adsorbentu, ktorý nie je pokrytý vrstvou mucínu viac ako v prípade povrchu pokrytého mucínom. Táto skutočnosť môže byť spôsobená vznikom nešpecifických interakcií medzi mikroporéznym hydrofilným povrchom sorbentu s vysokou drsnosťou a bakteriálnymi bunkami. Naopak naviazanie bakteriálnych buniek *L. rhamnosus* na sorbent pokrytý mucínom je spôsobený špecifickou interakciou. Existencia tejto interakcie je potvrdená na obrázku 6b, keďže aj na povrchu mucínu došlo k adsorpcii baktérií.

Zobrazovanie prostredníctvom skenovacej elektrónovej mikroskopie umožňuje zobraziť povrchové štruktúry sledovaného adsorbentu. Veľkou výhodou je zobrazenie povrchu adsorbentov

[illegible]

38



Obrázok 10: Zobrazenie povrchu sorbentu po adsorpcii *L. rhamnosus* (v stĺpcoch a a b sa nachádzajú rôzne zväčšenia tých istých vzoriek): 4 sorbent s naviazanou vrstvou mucínu, 5 sorbent po sorpcii *L. rhamnosus* bez povrchovej vrstvy mucínu, 6 sorbent s vrstvou mucínu po sorpcii *L. rhamnosus*

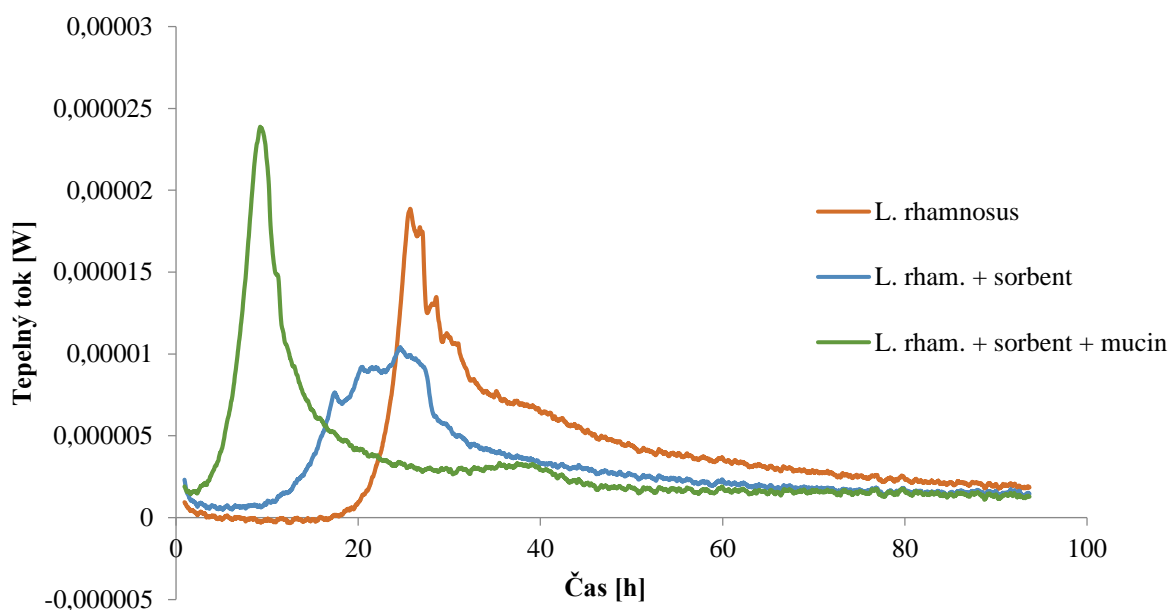
5.1.6 Mikrokolorimetria

Cieľom záverečného experimentu bolo overiť, či je pripravený modelový povrch využiteľný pri podrobnejšom štúdiu adhézie bakteriálnych buniek. Za týmto účelom bol navrhnutý pilotný mikrokolorimetrický experiment, zameraný na monitorovanie zmien, ktoré prítomnosť sorbentu s modelovým sorpčným povrchom vyvolá v dynamike metabolizmu buniek.

Kalorimetria slúži k sledovaniu rôznych tepelných zmien v priebehu merania. Experimenty prebiehajú za presne definovaných podmienok (konštantná teplota alebo objem vzorku) a zahŕňajú rôzne metódy (sorpčná, reakčná, prietoková alebo titračná kalorimetria). Daný experiment sa odohrával za konštantnej teploty a to 25 °C a bola využitá metóda sorpčnej kalorimetrie. Vzorky pripravené pre túto metódu obsahovali bakteriálny kmeň *L.rhamnosus*, adsorbent Amberlite IRA-900 a mucín. Na nasledujúcich

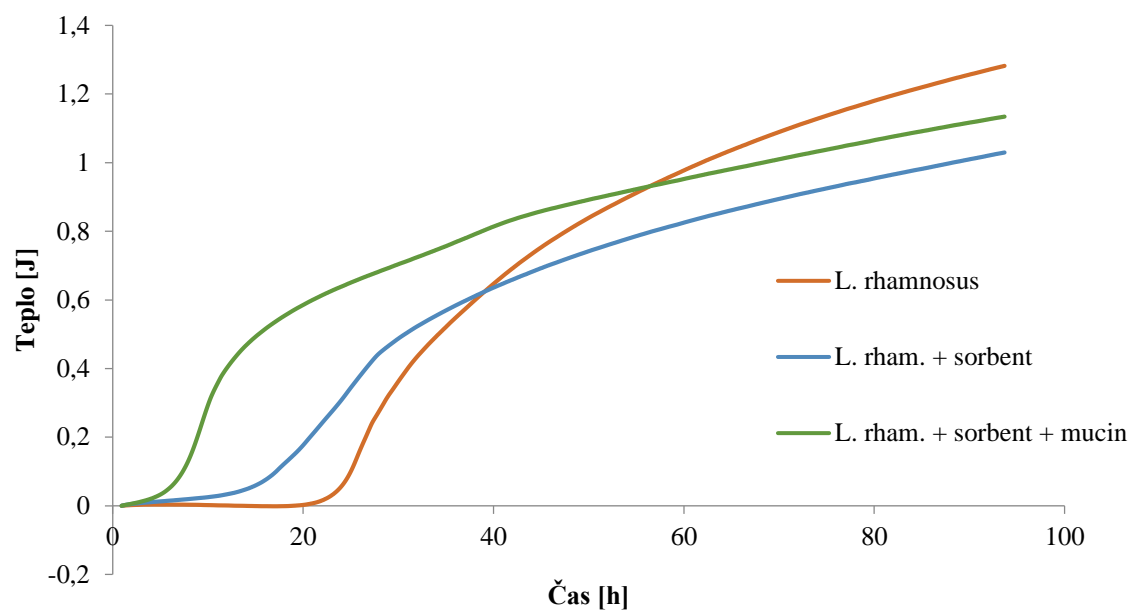
grafoch sú znázornené priebehy meraní 3 pripravených vzoriek za konštantnej teploty 25 °C. Každá vzorka bola pripravená v dvoch opakovaníach, kvôli kontrole.

Na grafe 13 vidíme zrejme rozdiely medzi jednotlivými vzorkami. Jednotlivé vzorky sa skladali z bakteriálnych buniek naadsorbovaných na čistom povrchu sorbentu IRA i na sorbente s vytvorenou vrstvou mucínu a v neposlednom rade boli analýze podrobené i vzorky, ktoré obsahovali v ampulách len bakteriálny kmeň *L. rhamnosus*. Z predloženého grafu môžeme usudzovať, že najrýchlejší priebeh reakcie vykazujú vzorky, ktoré obsahujú sorbent s naviazaným mucínom a bakteriálnym kmeňom. Ako druhá reakcia v poradí začala prebiehať sorpcia *L. rhamnosus* na čistý sorbent a až v poslednom rade vidíme nárast tepelného toku v prítomnosti samotného bakteriálneho kmeňa. Z toho vyplýva, že prítomnosť sorbentu urýchľuje adaptáciu baktérie a preto sa ich množenie a aktivita prejavuje za daných podmienok skôr.



Graf 13: Závislosť tepelného toku aktivity baktérií *L. rhamnosus* na čase pri teplote 25 °C

Z grafu 14 zase môžeme usúdiť, že aj napriek rozdielnej kinetike metabolizmu výsledné reakčné teplo jednotlivých reakcií nie je až tak odlišné. Tento fakt je zapríčinený tým, že všetky vzorky obsahujú približne rovnaké množstvo baktérií aj látok, ktoré dané baktérie potrebujú pre rast a množenie. Všetky vzorky boli pripravené v dvoch opakovaníach, ktoré potvrdili spomínané výsledky.



Graf 14: Závislosť celkového množstva reakčného tepla aktivity baktérií *L. rhamnosus* na čase pri teplote 25 °C

6 ZÁVER

Bakalárska práca bola zameraná na prípravu modelového povrchu vhodného pre následné sorpčné experimenty, a to predovšetkým z toho dôvodu, že charakterizácia adsorpcie bakteriálnych buniek na sorpčný povrch je dôležitá pre pochopenie prvého štádia tvorby bakteriálneho biofilmu. Pre experimentálne štúdium adsorpcie bakteriálneho kmeňa *Lactobacillus rhamnosus* bol dôležitou úlohou výber správneho sorpčného povrchu. Z predpokladu, že zvolený bakteriálny kmeň adhuje k hlavnej zložke hlienu gastrointestinálneho traktu mucínu – bola v prvom rade optimalizovaná metóda vytvorenia dostatočného pokrytia sorbentu mucínom. Prvá časť experimentálnej časti bakalárskej práce teda kládla dôraz na optimalizáciu modelového sorpčného povrchu simulujúceho povrch gastrointestinálneho traktu. Pre tento účel bolo nutné zvoliť najvhodnejší adsorbent pre naviazanie mucínu a tiež nemenej dôležitá optimalizácia pomeru medzi zvoleným sorbentom a mucínom.

Značný vplyv na sorpciu mal zvolený sorbent, pričom hralo dôležitú úlohu i jeho pomer s mucínom. Môžeme usudzovať, že sa počas experimentov podarilo vytvoriť sorpčný povrch vhodný k adsorpcii bakteriálneho kmeňa *Lactobacillus rhamnosus* a overiť teoretické predpoklady vplyvu sorpčného povrchu a experimentálnych podmienok na sorpciu daného bakteriálneho kmeňa. Ako povrch pre naviazanie mucínu boli použité sklenené guľôčky a mikročasticové polymérne adsorbenty Amberlite IRA-900, Amberlite XAD-4 a Supelite DAX-8. Prvotné experimenty preukázali najlepšie výsledky pri použití adsorbentu Amberlite IRA-900. V priebehu experimentálnej časti práce boli použité metódy UV-VIS spektrofotometria, infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou, skenovacia elektrónová mikroskopia a mikrokolorimetria.

Podstatnou úlohou bolo nájsť vhodné množstvo sorbentu a zvoliť optimálnu koncentráciu mucínu. Táto časť optimalizácie prebiehala za účelom vytvorenia sorpčného povrchu s najväčším pokrytím sorbentu vrstvou mucínu. Pri tomto procese sme dospeli k zisteniu, že pred samotným naviazaním mucínu na sorbent musí byť sorbent premytý, aby sme zaistili najlepšie podmienky pre interakciu medzi povrchom sorbentu a mucínom. Počas experimentu boli postupne odstraňované jednotlivé nežiaduce vplyvy (ako napr. uvoľňovanie látok zo sorbentu) a následne bol navrhnutý vhodný postup pre prípravu sorpčného povrchu. Premytím sorbentu pred naviazaním mucínu sme dokázali pripraviť povrch, ktorý interaguje s mucínom ale sám neuvoľňuje látky. V rámci experimentálnej časti boli pomocou fyzikálne-chemických analýz sledované zmeny na sorpčnom povrchu za cieľom pochopenia interakcií v priebehu sorpčného deja.

V priebehu analýzy pomocou infračervenej spektroskopie adhézie bakteriálnej kultúry *L. rhamnosus* na sorbent Amberlite IRA-900 sa nám postupne podarilo dokázať prítomnosť vrstvy mucínu na povrchu sorbentu i prítomnosť *L. rhamnosus* v povrchovej vrstve. Zastúpenie polysacharidov a proteínov v prvej sérii meraní preukázala prítomnosť vrstvy mucínu na povrchu sorbentu. V poslednej sérii experimentov sme vďaka preukázateľnému množstvu amidov dokázali prítomnosť bakteriálneho kmeňa *L. rhamnosus* aj po usušení vzoriek. Baktérie pri tvorbe biofilmu vytvárajú tzv. extracelulárne polymérne látky (EPS), ktoré sú tvorené polysacharidmi, proteínmi, nukleovými kyselinami, lipidy či inými biopolymermi. Práve vysoké zastúpenie amidov dokazuje prítomnosť EPS na povrchu štruktúry.

Pre dôkaz sorpcie buniek na vytvorený povrch bol tento povrch podrobený analýze povrchu pomocou metódy FTIR a ďalej zobrazený prostredníctvom SEM. Skenovacia elektrónová mikroskopia slúžila k detailnému zobrazeniu topografie povrchu. Vďaka tejto metóde sme i vizuálne overili prítomnosť bakteriálnych buniek na sorpčnom povrchu. Analýza však zobrazila aj znečistenie sorpčného povrchu, ktoré mohlo byť spôsobené sušením vzoriek v nesterilnej sušiarňi, soľami vyskytujúcimi sa v použitých roztokoch či pri nesprávnej manipulácii s jednotlivými vzorkami. Bakteriálne bunky *L. hamnosus* sa však vo väčšej miere sorbovali na čistý povrch sorbentu, ktorý neobsahoval mucín než na tento sorbent pokrytý vrstvou mucínu. Tento fakt môže byť spôsobený tým, že sa molekuly mucínu viažu k sorbentu IRA pomocou nešpecifických interakcií, zatiaľ čo adsorpcia na mucín prebieha len pri správnych podmienkach. *Lactobacillus rhamnosus* sa na mucín viaže prostredníctvom špecifických väzieb.

K sledovaniu kinetiky metabolizmu bakteriálnych buniek v závislosti na prítomnosti pripraveného modelového sorbentu bola použitá mikrokolorimetria, ktorá preukázala jasné rozdiely medzi rôznymi sorpčnými povrchmi. Najrýchlejší priebeh reakcie vykazovali vzorky obsahujúce sorbent s naviazaným mucínom a bakteriálnym kmeňom. Sorpčné reakcie prebiehajúce na povrchu čistého sorbentu začali prebiehať neskôr a naposledy sme sledovali tepelný tok samotného bakteriálneho kmeňa. Prítomnosť sorbentu preukázateľne ovplyvňuje rýchlosť adaptácie buniek.

Pomocou spojenia všetkých použitých techník sa podarilo preukázať, naviazanie mucínu na sorbent Amberlite IRA-900 ako aj samotná adsorpcia bakteriálneho kmeňa *L. rhamnosus* na povrch tvorený mucínom. Pochopiteľne je treba brať v úvahu, že existuje možnosť kontaminácie vzoriek. Preto by bolo pri ďalšom štúdiu potrebné potvrdiť resp. vyvrátiť kontamináciu, vzniknutú pri manipulácií so vzorkami v priebehu analýz, použitím ďalších techník či ďalšími opakovaniami experimentov za cieľom zníženia množstva kontaminácie alebo aspoň jeho definovania. Môžeme však usudzovať, že sa podarilo splniť zadanie bakalárskej práce a ďalšie štúdium adhézie bakteriálneho kmeňa *L. rhamnosus* na sorpčný povrch, simulujúci povrchovú vrstvu GIT, ako prvého kroku vzniku bakteriálneho biofilmu, môže pokračovať použitím výsledkov dokázaných touto experimentálnou prácou.

7 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] ATKINS, P. W. a Julio DE PAULA. *Atkins' Physical chemistry*. Tenth edition. New York: Oxford University Press, [2014]. ISBN 978-0199697403.
- [2] NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 9788070806753.
- [3] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠÍŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemickotechnologická, 2005. ISBN 80-708-0579-X.
- [4] KLOUDA, Pavel a Vladimír KARPENKO. *Fyzikální chemie*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2002. ISBN 80-863-6906-4.
- [5] KODÍČEK, Milan a Vladimír KARPENKO. *Biofyzikální chemie*. Praha: Academia, 2000. ISBN 80-200-0791-1.
- [6] MAREČEK, Aleš a Jaroslav HONZA. *Chemie pro čtyřletá gymnázia*. Vyd. 3. Brno, 2013. ISBN 80-902402-0-8.
- [7] HERMANSSON, Malte. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 14. 1999, 105–119.
- [8] PROCHÁZKOVÁ, Gita, Vladimír JIRKŮ, Lidmila BARTOVSKÁ a Tomáš BRÁNYIK. Použití fyzikálně-chemických nástrojů pro predikci mikrobiální adheze. *Chem. Listy*. 2011, (105), 856-863.
- [9] CARPENTIER, Brigitte a O. CERF. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*. 1993, 75(6), 499-511. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb01587.x. ISSN 00218847.
- [10] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0422-X.
- [11] LEAR, Gavin. *Biofilms in bioremediation: current research and emerging technologies*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2016. ISBN 978-1-91019029-6.
- [12] Five Ways You Can Use the Zetasizer Nano to Optimize Formulation Stability. AZO materials. 2017 [online]. Dostupné z: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=13442>.
- [13] SHARP, Jeffrey M. a Richard B. DICKINSON. Direct Evaluation of DLVO Theory for Predicting Long-Range Forces between a Yeast Cell and a Surface. *Langmuir*. 2005, 21(18), 8198-8203. DOI: 10.1021/la046765s. ISSN 0743-7463.
- [14] KASEMO, Bengt. Biological surface science. *Surface Science* [online]. 2002, **500**(1-3), 656-677 [cit. 2019-03-03]. DOI: 10.1016/S0039-6028(01)01809-X. ISSN 00396028. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003960280101809X>
- [15] DERRIEN, Muriel, Mark W.J. VAN PASSEL, Jeroen H.B. VAN DE BOVENKAMP, Raymond SCHIPPER, Willem DE VOS a Jan DEKKER. Mucinbacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes*. 2014, 1(4), 254-268. DOI: 10.4161/gmic.1.4.12778. ISSN 1949-0976.
- [16] ETZOLD, Sabrina a Nathalie JUGE. Structural insights into bacterial recognition of intestinal mucins. *Current Opinion in Structural Biology*. 2014, 28(2-3), 23-31. DOI: 10.1016/j.sbi.2014.07.002. ISSN 0959440x.
- [17] BANSIL, Rama, Bradley S. TURNER, Gregor REID, et al. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications: period: October 1957-February 1964. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. InTech, 2006, 11(2-3), 164-170. DOI: 10.1016/j.cocis.2005.11.001. ISBN 978-953-51-0955-6. ISSN 13590294.
- [18] BERGSTROM, K. S. B., L. XIA, Devon KAVANAUGH a Nathalie JUGE. Mucin-type O-glycans and their roles in intestinal homeostasis. *Frontiers in Genetics*. 2015, 6(19-20). DOI: 10.1093/glycob/cwt045. ISBN 10.1093/glycob/cwt045. ISSN 1664-8021.

- [19] TAILFORD, Louise E., Emmanuelle H. CROST, Devon KAVANAUGH, et al. Mucin glycan foraging in the human gut microbiome: period: October 1957February 1964. *Frontiers in Genetics*. InTech, 2015, 1965, 6(2-3). DOI: 10.3389/fgene.2015.00081. ISBN 978-953-51-0955-6. ISSN 1664-8021.
- [20] O'TOOLE, Paul W., Jakki C. COONEY, Lisa MURPHY, et al. Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota: correlation with in vivo findings. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2008, 2008(2), 1-9. DOI: 10.1155/2008/175285. ISSN 1687-708X.
- [21] DONLAN, R. M. a J. W. COSTERTON. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002, 15(2), 167-193. DOI: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002. ISSN 0893-8512.
- [22] VERTES, Akos, Victoria HITCHINS a K. Scott PHILLIPS. Analytical Challenges of Microbial Biofilms on Medical Devices [online]. 2012, 3858–3866 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1021/ac2029997. ISBN 10.1021/ac2029997. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac2029997>
- [23] FLEMMING, Hans-Curt a Jost WINGENDER. The biofilm matrix [online]. 2010, 623–633 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1038/nrmicro2415. ISBN 10.1038/nrmicro2415. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrmicro2415>
- [24] COSTERTON, J. Introduction to biofilm [online]. 1999, 59717 -3980 [cit. 2018-0325]. DOI: 10.1016/S0924-8579(99)00018-7. ISBN 10.1016/S0924-8579(99)00018-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857999000187>
- [25] GARRETT, Trevor Roger, Manmohan BHAKOO a Zhibing ZHANG. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces [online]. 2008, 1049-1056 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.pnsc.2008.04.001. ISBN 10.1016/j.pnsc.2008.04.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1002007108002049>
- [26] MONDS, Russell D. a George A. O'TOOLE. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review[online]. 2009, 73–87 [cit. 2018-0325]. DOI: 10.1016/j.tim.2008.11.001. ISBN 10.1016/j.tim.2008.11.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X09000055> [
- [27] ROSCHE, Bettina, Xuan Zhong LI, Bernhard HAUER, Andreas SCHMID a Katja BUEHLER. Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis? [online]. 2009, 636-643 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.08.001. ISBN 10.1016/j.tibtech.2009.08.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779909001565>
- [28] KLABAN, Vladimír. Svět mikrobů: malý mikrobiologický slovník. Hradec Králové: Gaudeamus, 1999. ISBN 80-704-1639-4
- [29] HOLZAPFEL, Wilhelm H, Petra HABERER, Rolf GEISEN, Johanna BJÖRKROTH, Ulrich SCHILLINGER, K. MUNRO, T. ALATOSSAVA a Leónides FERNÁNDEZ. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition: period: October 1957-February 1964. *The American Journal of Clinical Nutrition*. InTech, 2001, 1965, 73(2), 365s-373s. DOI: 10.1093/ajcn/73.2.365s. ISBN 978-953-51-0955-6. ISSN 0002-9165.
- [30] NĚMEC, Miroslav a Dagmar MATOULKOVÁ. Základy obecné mikrobiologie. Brno: Masarykova univerzita, 2015. ISBN 978-80-210-7923-6.
- [31] VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie speciální. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902-8966-5.
- [32] KANKAINEN, M., L. PAULIN, S. TYNKKYNNEN, et al. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human- mucus binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, 106(40), 17193-17198. DOI: 10.1073/pnas.0908876106. ISSN 0027-8424.
- [33] REUNANEN, Justus, Ingemar VON OSSOWSKI, Antoni P. A. HENDRICKX, Airi PALVA a Willem M. DE VOS. Characterization of the SpaCBA Pilus Fibers in the Probiotic *Lactobacillus*

- rhamnosus GG. Applied and Environmental Microbiology. 2012, 78(7), 2337-2344. DOI: 10.1128/AEM.07047-11. ISSN 00992240.
- [34] Easy biology class [online]. Dostupné z: <http://www.easybiologyclass.com/wpcontent/uploads/2017/05/Difference-between-Flagella-and-Fimbriae.jpg>.
- [35] AVLAMI, A., T. KORDOSSIS, N. VRIZIDIS a N.V. SIPSAS. Lactobacillus Rhamnosus Endocarditis Complicating Colonoscopy. *Journal of Infection* [online]. 2001, **42**(4), 283-285 [cit. 2019-03-03]. DOI: 10.1053/jinf.2001.0793. ISSN 01634453. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445301907935>
- [36] DOBSON, C Melissa, Bonnie CHABAN, Harry DENEER, Barry ZIOLA, D. M. LOACH, K. MUNRO a T. ALATOSSAVA. Lactobacillus casei , Lactobacillus rhamnosus , and Lactobacillus zeae isolates identified by sequence signature and immunoblot phenotype: period: October 1957-February 1964. Canadian Journal of Microbiology. 2004, 1965, 50(7), 482-488. DOI: 10.1139/w04-044. ISSN 00084166.
- [37] ONG, Yea-Ling, Annetta RAZATOS, George GEORGIOU a Mukul M. SHARMA. Adhesion Forces between E. coli Bacteria and Biomaterial Surfaces [online]. 1999, 2719-2725 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1021/la981104e. ISBN 10.1021/la981104e. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la981104e>
- [38] ABSOLOM, Darryl R., Francis V. LAMBERTI, Zdenka POLICOVA, Walter ZINGG, Carel J. VAN OSS, a A. Wilhelm NEUMANN. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. [online]. 1983, 90-97 [cit. 2018-03-25]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/16782931_Surface_thermodynamics_of_bacterial_adhesion
- [39] REDMAN, Jeremy A., Sharon L. WALKER a Menachem ELIMELECH. Bacterial Adhesion and Transport in Porous Media: Role of the Secondary Energy Minimum [online]. 2004, 1777-1785 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1021/es034887l. ISBN 10.1021/es034887l. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es034887l>
- [40] PEMBREY, Richard S., Kevin C. MARSHALL a René P. SCHNEIDER. Cell Surface Analysis Techniques: What Do Cell Preparation Protocols Do to Cell Surface Properties? [online]. 1999, 65(7), 2877-2894 [cit. 2018-03-25]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91432/>
- [41] NEU, Thomas R. a John R. LAWRENCE. Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales [online]. 2015, 419-20 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.tim.2014.12.010. ISBN 10.1016/j.tim.2014.12.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X14002674>
- [42] AZEREDO, Joana, Nuno F. AZEVEDO, Romain BRIANDET, et al. Critical review on biofilm methods [online]. 2016, 1549-7828 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1080/1040841X.2016.1208146. ISBN 10.1080/1040841X.2016.1208146. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1040841X.2016.1208146>
- [43] DENKHAUS, Evelin, Stefan MEISEN, Ursula TELGHEDER a Jost WINGENDER. Chemical and physical methods for characterisation of biofilms [online]. 2007, 1-27 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1007/s00604-006-0688-5. ISBN 10.1007/s00604-006-0688-5. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00604-006-0688-5>
- [44] HALAN, Babu, Katja BUEHLER a Andreas SCHMID. Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses [online]. 2016, 453-465 [cit. 2018-03-25]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.05.003. ISBN 10.1016/j.tibtech.2012.05.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779912000741>

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

8.1 Zoznam použitých skratiek

AAS	Atómová absorpčná spektrometria
AFM	Mikroskopia atomárnych síl
CE	Kapilárna elektroforéza
CLSM	Konfokálna laserová skenovacia mikroskopia
dH ₂ O	Deionizovaná voda
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeekova teória
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EPS	Extralekulárne polysacharidy
FISH	Fluorescenčná in situ hybridizácia
GIT	Gastrointestinálny trakt
IR	Infračervená spektroskopia
MATH	Mikrobiálna adhézia k uhlíkovodíkom
MRS	Man rogoša sharpe
NMR	Nukleárna magnetická rezonancia
OCT	Optická koherentná tomografia
PCR	Polymerázová reťazová reakcia
RTG	Rentgenová spektroskopia
SEM	Skenovacia elektrónová mikroskopia
STP	Serin, threonin a prolin doména
UV-VIS	Ultrafialovo-viditeľná spektroskopia
XDLVO	Rozšírená Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeekova teória

8.2 Zoznam použitých symbolov

Symbol	Význam	[jednotka]
a	adsorbované množstvo	[mol/kg]
A	absorbancia	[-]
c	koncentrácia	[mol/l]
d	vzdialenosť povrchov	[m]
G	Gibbsova energia	[J]
I	iónová sila	[mol/l]
OD ₆₀₀	optická hustota	[-]
p	tlak	[Pa]
R	univerzálna plynová konštanta	[J/K·mol]
T	teplota	[°C]
t	čas	[s]
γ	povrchové napätie	[N/m]
λ	vlnová dĺžka	[nm]
Γ	relatívna adsorpcia	[mol/m ²]
ζ	Zeta-potenciál	[mV]